

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**Instituto de Química e Biotecnologia**  
**Curso de Química Tecnológica e Industrial**

**Evaniely Letícia Ferreira Onório**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE FORMULAÇÕES INFANTIS PARA  
PREPARAÇÃO DE MAMADEIRAS EM UM LACTÁRIO DE MACEIÓ**

**Maceió – AL**

**2022**

**Evaniely Letícia Ferreira Onório**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE FORMULAÇÕES INFANTIS PARA  
PREPARAÇÃO DE MAMADEIRAS EM UM LACTÁRIO DE MACEIÓ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica e Industrial.

Orientadora: Thaysa Barbosa Cavalcante Brandão

**Maceió – AL**

**2022**

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

O58q Onório, Evaniely Leticia Ferreira.

Qualidade microbiológica de formulações infantis para preparação de mamadeiras em um lactário de Maceió / Evaniely Leticia Ferreira Onório. – Maceió, 2022.

[74] f. : il.

Orientadora: Thaysa Barbosa Cavalcante Brandão.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica e Industrial) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. [66]-[72].

Anexos: f. [73]-[74].

1. Fórmulas lácteas infantis (Indústria de laticínios). 2. Lactário hospitalar - Maceió (AL). 3. Micro-organismos indicadores. I. Título.

CDU: 637.1

## RESUMO

As formulações lácteas infantis são uma fonte importante de nutrição para lactentes, pois dependem desse alimento para crescerem e se desenvolverem durante o primeiro ano de vida. No entanto, uma grande preocupação surge quando nos lactários hospitalares há indícios de contaminação dessas formulações por micro-organismos patogênicos, colocando assim, a vida dos lactentes em risco de infecção e intoxicação alimentar. Com isso, esse trabalho objetivou avaliar a qualidade microbiológica de formulações lácteas de um lactário hospitalar, localizado na cidade de Maceió, Alagoas, Brasil. Para isso, foram coletadas amostras de diferentes formulações infantis (14 tipos) utilizadas nesse lactário, durante os anos de 2015 – 2020. A partir dessas amostras, avaliou-se a presença dos micro-organismos indicadores: coliformes totais e termotolerantes, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus coagulase positivo*. Os resultados obtidos puderam mostrar deficiência de higiene, provavelmente durante o processo de manipulação das formulações, já que certas amostras se apresentaram fora dos padrões microbiológicos para coliformes e *Bacillus cereus*. Quanto para *Salmonella spp.* e *Staphylococcus*, o lactário parece atender a legislação vigente, uma vez que o nível de contaminação está dentro dos padrões microbiológicos para esses dois micro-organismos. Assim, é possível concluir que nesse lactário a falta de cuidados adequados pode estar colaborando para a presença de micro-organismos patogênicos nas formulações infantis, no que diz respeito a coliformes e *Bacillus cereus*. É necessário que o hospital em questão contribua com maior rigor no preparo dessas formulações, para que os lactentes não tenham sua saúde comprometida.

**Palavras-chave:** Fórmulas lácteas infantis; Lactário hospitalar; Micro-organismos indicadores.

## ABSTRACT

Infant milk formulas are an important source of nutrition for infants, as they depend on this food to grow and develop during the first year of life. However, a major concern arises when there are signs of contamination of these formulations by pathogenic microorganisms in hospital lactaries, thus putting the lives of infants at risk of infection and food poisoning. Therefore, this study aimed to evaluate the microbiological quality of milk formulations from a hospital lactary located in the city of Maceió, Alagoas, Brazil. For this, samples of different infant formulas (14 types) used in this lactary were collected during the years 2015 - 2020. From these samples, the presence of indicator microorganisms was evaluated: total and thermotolerant coliforms, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* and *Staphylococcus*. The results obtained showed that in this lactary there is a certain lack of hygiene control, probably during the process of handling the formulations, since certain samples were outside the microbiological standards for coliforms and *Bacillus cereus*. As for *Salmonella spp.* and *Staphylococcus*, the lactary seems to meet the standard hygiene conditions, since the level of contamination is within the microbiological standards for these two microorganisms. Thus, it is possible to conclude that in this lactary the lack of adequate care may be contributing to the presence of pathogenic microorganisms in infant formulas, with regard to coliforms and *Bacillus cereus*. It is necessary for the hospital in question to contribute more rigorously to the preparation of these formulations, so that infants do not have their health compromised.

**Keywords:** Infant milk formulas; Hospital lactary; Indicator microorganisms.

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Dimensionamento da área do lactário segundo RDC nº 50 (2002) e RDC nº 307 (2002);

Quadro 2 – Classificação de cada tipo de leite de acordo com a formulação láctea;

Quadro 3 – Classificação de cada tipo de leite de acordo com a formulação láctea;

Quadro 4 – Exemplo para calcular os resultados em UFC/g.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Como praticar a higienização das mãos.....17

### MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 2. Esquema representativo da preparação de amostra e diluição.....36

Figura 3. Esquema representativo da determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes (45 °C) .....37

Figura 4. Esquema representativo de análise para contagem de *B. cereus* por plaqueamento direto.....44

Figura 5. Esquema representativo de análise de *S. aureus* pelo método de contagem direta em placas.....46

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 6. Presença de Coliformes Totais em formulações lácteas.....49

Figura 7. Porcentagem de *Bacillus cereus* .....52

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1: Padrões microbiológicos para alimentos de acordo com a RDC N° 331 determinada pela ANVISA.....24

### MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2: Classificação de cada tipo de leite de acordo com a formulação láctea....34

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3: Número de amostras que foram avaliadas a presença ou ausência de coliformes totais nas formulações lácteas entre 2015 e 2020.....48

Tabela 4: Número de amostras que foram avaliadas a presença ou ausência de *Bacillus cereus* nas formulações lácteas entre 2015 e 2020.....54

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Microbiologia de Alimentos	10
2.2 Microbiologia associada à lactários	13
2.3 Medidas sanitárias ideais para preparação de formulações lácteas	15
2.4. Avaliação microbiológica de formulações lácteas e riscos associados a formulações lácteas contaminadas	24
3 HIPÓTESE	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo geral:	36
4.2 Objetivos específicos:	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 Caracterização do estudo e Amostragem	37
5.2 Retirada da unidade analítica	37
5.3 Preparo da diluição das amostras	39
5.4 Análise de coliformes totais e coliformes a 45 oC	39
5.5 Análise de Salmonella spp.	42
5.6 Análise de Bacillus cereus	46
5.7 Análise de Staphylococcus aureus coagulase positiva	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6.1 Avaliação de Coliformes totais e coliformes termotolerantes (45 °C)	56
6.2 Avaliação da presença de Salmonella spp.	58
6.3 Avaliação da presença de Bacillus cereus	59
6.4 Avaliação da presença de Staphylococcus coagulase +	61
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1	72
ANEXO 2	73

## 1 INTRODUÇÃO

O leite materno é considerado o alimento adequado para a nutrição de lactentes de 0 até os dois anos de vida. Essa fonte alimentar, além de conter os nutrientes necessários para o desenvolvimento nessa fase da vida, possui importância do ponto de vista imunológico, que permite os lactentes adquirirem resistência imunológica para enfrentar possíveis infecções. Entretanto, quando não é possível alimentar esses indivíduos com o leite materno, é introduzida uma alimentação à base de fórmulas desidratadas infantis (FDI), as formulações lácteas (WHO, 2007).

Formulações lácteas podem ser ofertadas aos lactentes até 11 meses e 29 dias de vida. Essas formulações são administradas em quantidades recomendadas de acordo com a idade e necessidades nutricionais dos lactentes, ofertando quantidades balanceadas de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas) e micronutrientes. No entanto, as formulações lácteas podem oferecer perigo à saúde dos lactentes em lactários hospitalares, devido a falhas de higiene durante o preparo, podendo favorecer a contaminação e/ou crescimento de micro-organismos patogênicos (ANVISA, 2018).

O sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) surge, atualmente, como uma importante ferramenta para a qualidade alimentar (McNab, 1998; National Advisory..., 1998). Seu uso torna-se fundamental, principalmente nos estabelecimentos onde a preparação de alimentos necessita de rigorosas condições de higiene, como é o caso das Centrais de Sondas e Lactários onde são preparadas dietas enterais e fórmulas lácteas.

Este trabalho objetiva verificar a qualidade microbiológica de formulações lácteas ofertadas em mamadeiras aos lactentes de um hospital da cidade de Maceió, Alagoas, Brasil. Sendo assim o trabalho a seguir foi estruturado da seguinte forma: primeiro, serão abordados na revisão da literatura, temas associados a microbiologia geral e voltada para lactários, focando nas formulações lácteas; em seguida, os temas explorados envolvem recomendações para o preparo das formulações em lactários, avaliação microbiológica de formulações lácteas e por último, foi explorado como os micro-organismos patogênicos (focando

principalmente os estudados nesta pesquisa) associados a contaminação alimentar estão correlacionados com algumas ocorrências de cunho clínico patológico.

Após abordar as informações associadas ao tema do trabalho, deu-se continuidade apresentando os materiais e métodos utilizados na avaliação microbiológica das formulações lácteas. Os resultados obtidos foram descritos e discutidos de acordo com trabalhos da literatura, chegando então à conclusão final obtida após discussão dos principais achados.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Microbiologia de Alimentos**

A Microbiologia é uma ciência, ramo da Biologia, que se propõe estudar os seres vivos microscópicos e seus diferentes aspectos como sua morfologia, estrutura, fisiologia, características genéticas, formas de reprodução, taxonomia e como esses seres interagem com outros seres e com o meio ambiente. Também é possível expandir os estudos microbiológicos para aplicações industriais dos micro-organismos, envolvendo processos biotecnológicos (TRABULSI, 2015).

Essa ciência teve como marco inicial, os estudos realizados por Antony Van Leuwenhoek (1632 – 1723), que usando um microscópio ainda precário, comparado aos atuais, observou em diferentes amostras (águas, saliva, fezes, etc.) objetos muito pequenos incapazes de serem vistos a olho nu. Esses objetos pequenos foram chamados por Leuwenhoek de “animáculos” por acreditar que seriam pequenos animais vivos e Leuwenhoek pode observar que esses seres se moviam e possuíam formas diferentes. Dessa forma, os principais tipos de micro-organismos existentes que conhecemos na atualidade (protozoários, algas, fungos e bactérias) foram primeiramente descritos por Leuwenhoek (CARVALHO, 2010).

A origem desses micro-organismos se tornou alvo dos cientistas após sua descoberta, levando esses cientistas a acreditarem que esses seres se originaram e se dividiram de duas formas diferentes, definidas como biogênese e abiogênese. De acordo com a linha de pensamento da biogênese, esses seres surgiram a partir de uma “semente”, ou seja, os micro-organismos já existem no ambiente e ao encontrar condições favoráveis, esses seres são capazes de se desenvolver e se multiplicar. Ao contrário, na abiogênese, também conhecida como geração espontânea, os micro-organismos surgiram a partir da matéria orgânica que estava em decomposição ou putrefação (CARVALHO, 2010).

Com o passar das décadas e com a evolução tecnológica, ficou cada vez mais difícil de acreditar na origem abiogênica dos micro-organismos. John T. Needham (1713 -1781) foi um grande defensor da abiogênese, realizando experimentos, no ano de 1749, com caldo aquecido e percebendo que ainda

creciam micro-organismos. Seus experimentos não foram realizados nas condições ideais de higiene e isso levou a dúvidas sobre a veracidade acerca da abiogênese. Esses estudos despertou a curiosidade de outro pesquisador, Lazzaro Spallanzani (1729 -1799), que décadas depois realizou diversas experimentações levando infusões a esterilização e considerando o contato de frascos com ar, chegando à conclusão de que esses fatores influenciavam na presença ou ausência de micro-organismos (PRESTES e CREVELARIO DE CARVALHO, 2012).

Mais tarde, o químico francês Louis Pasteur (1822 – 1895) foi responsável por concluir que o contato do ar com estava relacionada com a contaminação de caldos nutritivos e aquecidos. Seus experimentos com frascos de pescoço longo curvado em **V**, mostraram que a poeira presente no ar ficava retida na área sinuosa do frasco e os micro-organismos não cresciam no caldo. Pasteur foi um grande contribuinte para impulsão da tecnologia dos alimentos e criou assim o processo de pasteurização dos alimentos, capaz de preservar os alimentos (BORDENAVE, 2003; CARVALHO, 2010).

O ramo da microbiologia que se preocupa com os processos no qual os micro-organismos influenciam nas características dos produtos para alimentação humana e alimentar é chamado de microbiologia dos alimentos. Na microbiologia dos alimentos, estão envolvidos tanto os organismos que constituem a microbiologia, quanto os processos biotecnológicos associados a produção dos alimentos. Dentro da microbiologia dos alimentos, os microrganismos podem ser classificados como: agentes responsáveis pela deterioração dos alimentos, agentes patogênicos transmitidos pelos alimentos e os produtores de alimentos. Nesse sentido, cada vez mais tem se buscado aperfeiçoar os cuidados com os alimentos a fim de conservá-los e prevenir a transmissão de doenças causadas por microorganismos (SEDUC, 2012; FORSYTHE, 2013).

A busca pelo alimento saudável e de qualidade acompanha a evolução da humanidade e vai desde a seleção de plantas e animais adequados para o consumo humano, passando por um cultivo adequado até alcançar uma escala de maior nível tecnológico, sendo este aplicado principalmente nas indústrias, seja para detectar a presença de micro-organismos indesejáveis ou seus produtos, assim como a

aplicação de micro-organismos cuja atividade, pode, por exemplo, auxiliar na fermentação de produtos (SEDUC, 2012; FORSYTHE, 2013).

Os micro-organismos presentes nos alimentos podem ter origem de diferentes fontes que incluem, solo e água, ar e poeira, plantas e derivados, microorganismos do trato gastrointestinal e os que estão presentes nos alimentos por práticas sanitárias e de higiene de manipuladores de alimentos. Alguns fatores intrínsecos e extrínsecos como acidez, oxigênio, umidade e temperatura podem influenciar diretamente na qualidade do alimento e na propensão do desenvolvimento de micro-organismos.

Se tratando de fatores intrínsecos, microrganismos dependem da água disponível para a sua sobrevivência e esse fator está diretamente relacionado com a umidade, outro fator favorável para o desenvolvimento de micro-organismos. O pH do meio pode favorecer sua multiplicação, sendo a faixa de pH entre 4,0 – 4,5 (ácido) a mais favorável para esse desenvolvimento. A quantidade de nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais) também é um fator limitante para o desenvolvimento dos micro-organismos (FRANCO e LANDGRAF, 2005; CARVALHO, 2010; FORSYTHE, 2013).

Dos fatores extrínsecos, a temperatura exerce grande influência no crescimento e desenvolvimento de microrganismos em alimentos, já que interfere na velocidade das reações químicas necessárias para esse crescimento microbiológico. Temperaturas que variam entre 20° – 47° C são propensas ao surgimento de micro-organismos, mas algumas espécies termófilas podem crescer entre 50° - 60° C. Em geladeira, outros microrganismos podem crescer em temperaturas entre 10° - 15 ° C. Por esse motivo, os alimentos muitas vezes são conservados sob baixas temperaturas (FRANCO e LANDGRAF, 2005; CARVALHO, 2010; FORSYTHE, 2013).

Algumas bactérias precisam de condições específicas para sua sobrevivência, como a presença de oxigênio. Micro-organismos podem depender de oxigênio ou podem necessitar de dióxido de carbono para se desenvolverem, já outros não toleram a presença de oxigênio. Também existem micro-organismos que são aeróbias-anaeróbias facultativas, como as bactérias de interesse da indústria alimentar (FRANCO e LANDGRAF, 2005; CARVALHO, 2010; FORSYTHE, 2013).

Enfatizando um potencial patogenicidade, microorganismos como vírus, bactérias e fungos podem estar presentes nos alimentos devido a uma higiene precária, podem estar presentes em alimentos adquiridos de áreas contaminadas ou ainda ser transmitidos por animais. Vírus, como o da hepatite A, podem ser adquiridos ao se consumir moluscos, frutas e vegetais crus. Fungos podem estar presentes em nozes e cereais e bactérias, incluindo *Bacillus spp.*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* e *Vibrio*, são microorganismos que podem estar presentes em alimentos crus e processados e de origem animal como, por exemplo, os produtos lácteos (FRANCO e LANDGRAF, 2005; CARVALHO, 2010; FORSYTHE, 2013).

Tendo em vista as características da microbiologia e da microbiologia na alimentação, fica evidente que o controle da qualidade do alimento precisa estar adequado às normas de higiene, uma vez que os diversos micro-organismos, como os anteriormente citados, podem tanto inviabilizar o consumo de um determinado alimento, quanto ser responsável por causar prejuízos à saúde humana.

## **2.2 Microbiologia associada à lactários**

Lactários nos Estabelecimentos de Saúde (EAS), de acordo com a RDC nº 50 de 2002, são unidades com área restrita que se destinam à limpeza, esterilização, preparo e guarda de mamadeiras, basicamente, de fórmulas lácteas. Alguns setores desses estabelecimentos podem compartilhar uma área de Nutrição Enteral, na qual são preparados alimentos “*in natura*” destinados a substituir ou complementar a alimentação oral de pacientes em regime hospitalar. Alimentos à base de cereais, leite e leite modificados também podem ser preparados nessas instalações, com a finalidade de alimentar lactentes e crianças de primeira infância (MEZOMO, 1987; BRASIL, 2002).

O objetivo principal de um lactário hospitalar é providenciar alimentação apropriada e segura, levando em consideração os aspectos microbiológicos e nutricionais, proporcionando assim aos recém-nascidos, lactentes e crianças, promoção da saúde e/ou recuperação. Esses aspectos são considerados, uma vez que alimentos são um veículo de contaminação humana por micro-organismos

patogênicos quando não há uma condição higiênico-sanitária adequada ao se manipular tais alimentos. E se tratando dos ambientes de preparo de alimentos “*in natura*” e o ambiente em que se é realizada a limpeza e higienização dos insumos de preparos desses alimentos, esses devem obrigatoriamente ser separados dos lactários cujas fórmulas e alimentos infantis são preparados, a fim de se evitar contaminação (ILSI-BRASIL, 2017).

Por diferentes razões, recém-nascidos e crianças que ainda necessitam de amamentação, mas não dispõem de aleitamento materno, precisam ser alimentadas com formulações lácteas, que devem passar por um rigoroso controle microbiológico hospitalar nos lactários. O leite é uma excelente fonte de nutrientes para os lactentes, mas também um meio de cultura ideal para o crescimento de micro-organismos que, a depender da sua quantidade, faixa etária do lactente e condições de saúde dos mesmos, podem ser um risco à saúde. Dependendo da condição de higiene do lactário ou se os hospitais não possuem uma área adequada para o preparo de formulações infantis, é possível que seja identificada a presença de micro-organismos nesses locais e nas formulações, como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus cereus*, coliformes e *E. coli*. A falta de higiene se torna assim o fator crucial para que ocorra tais contaminações (BARROS, 1997; MOMESSO, LANZIOTTI e CAPRONI, 2016).

O local de preparo das formulações, em termos de higiene do ambiente, pode não ser especificamente a origem de micro-organismos patogênicos presentes nas formulações infantis. Os lactários podem apresentar condições adequadas de higiene. No entanto, as condições de higiene dos manipuladores dessas formulações infantis contribuem para que haja ou não o crescimento microbiano tanto no ambiente de trabalho quanto nas formulações. Investigando esse fator, De Salles e Goulart (1997) avaliaram as condições higiênico-sanitárias dos lactários hospitalares em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Os autores puderam evidenciar que os lactários apresentaram boas condições higiênico-sanitárias, porém, 45,9% das amostras de preparações lácteas foram positivas para contagem de coliformes totais. Além disso, *E. coli* e *S. aureus* foram detectados nas mãos dos manipuladores e *S. aureus* detectado na região orofaríngea dos manipuladores dos lactários.

Outra forma de contaminação de fórmulas infantis é o setor industrial onde essas fórmulas são produzidas. Muitas vezes, as fórmulas chegam ao seu destino já contaminadas e por esse motivo a higiene deve ser feita desde o momento em que esses produtos são recebidos nos lactários hospitalares. Alguns micro-organismos podem ser destacados quanto a origem e local onde se desenvolvem, gerando contaminação das fórmulas lácteas: a presença de *Salmonella entérica* nos alimentos infantis pode ocorrer devido à falta de higiene, contaminação da matéria-prima ou do ambiente; *Clostridium botulinum* parece ocorrer com menos frequência em fórmulas infantis; *S. aureus* normalmente é detectada na pele e mão de manipuladores de alimentos e se torna uma fonte importante de contaminação por produtos manipulados por eles e que são ingeridos; *B. cereus* e também seus esporos frequentemente contaminam produtos lácteos em forma de pó e os esporos germinam quando esses produtos são reconstituídos e mantidos em temperatura ambiente. Vale salientar que *Salmonella enterica* é um dos micro-organismos com maior frequência de associação com surtos alimentares em lactentes e crianças de primeira infância (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Assim, todas as medidas de segurança cabíveis devem ser empregadas para minimizar e evitar a contaminação de lactentes hospitalares por microrganismos. Os cuidados partem desde a chegada dos produtos lácteos aos hospitais, do ambiente de manipulação e utensílios utilizados e se estende até os manipuladores de fórmulas infantis.

### **2.3 Medidas sanitárias ideais para preparação de formulações lácteas**

As medidas higiênico-sanitárias para o preparo de formulações infantis visam evitar que essas formulações contenham qualquer micro-organismo capaz de gerar algum tipo de patogenicidade aos lactentes. Essas medidas foram determinadas pois as Fórmulas Desidratadas para Lactentes (FDL) têm sido associadas a infecção e doença grave em lactentes, podendo essa contaminação ocorrer durante o processo de produção das formulações e ao manejo feito pelos manipuladores de fórmulas lácteas. Pensando nisso, a comissão do *Codex Alimentarius* revisou o *Code of Hygienic Practice for Foods for Infants and Children*, a partir do parecer científico solicitado à Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações

Unidas (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2007; FAO/WHO., 2007).

Para os lactentes, principalmente os mais vulneráveis, recomenda-se o uso de fórmulas líquidas comerciais estéreis, pois essas são livres de micro-organismos patogênicos. No entanto, pode ser que estabelecimentos de prestação de cuidados (hospitais e as creches) não possuam essas fórmulas estéreis, se fazendo necessário o uso das FDL. As FDL não são estéreis e portanto possuem maior risco de conter microorganismos patogênicos (WHO, 2007; ILSI-BRASIL, 2017; FAO/WHO., 2007).

As recomendações para o preparo das formulações infantis, de acordo com a OMS e a FAO (2007) e ILSI-BRASIL (2017), estabelecem de forma geral, o processo de higienização do ambiente de preparo, no caso dos hospitais é o lactário, higiene dos manipuladores das formulações e higiene dos equipamentos e utensílios.

- Processos de higiene ambiental, equipamentos e utensílios:

O processo de higienização do ambiente de preparo das formulações e dos utensílios engloba limpeza e desinfecção. A limpeza manual para remoção de sujidades pode ser feita por fricção, utilizando escova e solução detergente em ambiente e em utensílios e superfícies de contato com o alimento. A limpeza pode ser feita diariamente ou de rotina e para pisos, paredes, portas e outras superfícies internas, o prazo máximo para limpeza é de 15 dias (WHO, 2007; ILSI-BRASIL, 2017; FAO/WHO., 2007).

Limpeza mecânica, utilizando lavadoras com jato quente (que operam com processos de enxágue associados e em temperatura e tempo padronizados), pode ser aplicada em equipamentos, como copo de liquidificador, e mamadeiras e utensílios utilizados no preparo das formulações infantis. Para lavagem de equipamentos a temperatura recomendada é de 55°C a 65°C, e de 80°C a 90°C para enxágue. Mamadeiras podem ser imersas em solução de água a pelo menos 42°C, com detergente neutro e o auxílio de escova para mamadeira é recomendado. O processo de lavagem deve ser feito até a remoção total da sujidade. Os bicos

devem ser lavados ao avesso, com escova apropriada e enxágue em água corrente. As mamadeiras são finalizadas ao fazer a desinfecção física (termo desinfecção) de alto nível ou esterilização em autoclave (121°C), por 15 minutos, para também eliminar as formas esporuladas de bactérias, fungos e vírus. Mamadeiras e utensílios de contato com o alimento infantil precisam ser livres de bisfenol A, devido a sua baixa resistência a altas temperaturas. Sendo assim, as mamadeiras devem ser de material plástico com base de polietileno misturado (WHO, 2007; ILSI-BRASIL, 2017; FAO/WHO., 2007).

Para desinfecção, alguns agentes químicos como hipoclorito de sódio (0,02% ou 200 partes por milhão (ppm) de cloro ativo para superfície) e álcool etílico a 70% têm sido utilizados para desinfecção do ambiente, equipamentos e utensílios. Contudo, alguns materiais como mamadeiras e certos utensílios de plástico podem apresentar rachaduras e desgaste e descoloração devido à ação corrosiva do hipoclorito de sódio; o uso nesses materiais não é recomendado em hospitais. Quanto ao álcool etílico a 70%, este pode ser utilizado deixando agir durante dois minutos ou até secar, para eliminação dos micro-organismos. A aplicação recomendada é que seja feita a aplicação usando borrifador devidamente limpo e identificado (WHO, 2007; ILSI-BRASIL, 2017; FAO/WHO., 2007).

É importante que durante esse processo de higiene dos materiais e do ambiente, faça-se uso de Equipamentos de Proteção Individual (luvas, óculos, avental, máscara) para garantir a integridade física e a saúde dos funcionários do lactário.

- Higienização dos manipuladores:

Os profissionais responsáveis pelas atividades no lactário são denominados lactaristas e precisam ser profissionais capacitados para desempenhar suas funções. Em um lactário, os lactaristas são responsáveis pela execução operacional das atividades que envolvem o recebimento e armazenamento de produtos, envase e distribuição de fórmulas e alimentos infantis, higienização de mamadeiras, utensílios e equipamentos de utilização na produção (ILSI-BRASIL, 2017). Esses

profissionais utilizam a uniformização padrão para os ambientes hospitalares de acordo com as orientações da Norma Regulamentadora 32 do Ministério do Trabalho 25 e da Portaria 2619 de 2011 (BRASIL, 2011). Roupas privativas no hospital devem ser armazenadas em ambiente fechado até que sejam limpas e higienizadas. O uso de adornos é proibido e a troca de roupas é feita em uma antessala.

Os lactaristas são orientados a higienizar as mãos ao chegar no trabalho, quando interrompido o serviço ou quando tocar em objetos não higienizados (WHO, 2007; ILSI-BRASIL, 2017; BRASIL, 2011). Durante a manipulação dos alimentos, algumas práticas não são permitidas:

- Falar, cantar, assobiar, tossir, espirrar, cuspir, fumar;
- Mascar goma, palito, fósforo ou similares, chupar balas, comer;
- Experimentar alimentos com as mãos;
- Tocar o corpo;
- Assoar o nariz, colocar o dedo no nariz ou ouvido, mexer no cabelo ou pentear-se;
- Enxugar o suor com as mãos, panos ou qualquer peça da vestimenta;
- Manipular dinheiro;
- Fumar;
- Tocar maçanetas com as mãos sujas;
- Fazer uso de utensílios e equipamentos sujos;
- Trabalhar diretamente com alimento quando apresentar problemas de saúde, por exemplo, ferimentos e/ou infecção na pele, ou se estiver resfriado ou com gastroenterites;
- Circular sem uniforme nas áreas de serviço
- As mãos dos profissionais devem ser higienizadas de acordo com as recomendações

Figura 1 - Como praticar a higienização das mãos:

## Como Fazer a Fricção Anti-Séptica das Mãos com Preparações Alcoólicas?

Friccione as mãos com Preparações Alcoólicas! Higienize as mãos com água e sabonete apenas quando estiverem visivelmente sujas!

 Duração de todo o procedimento: 20 a 30 seg



## Como Higienizar as Mãos com Água e Sabonete?

Higienize as mãos com água e sabonete apenas quando estiverem visivelmente sujas! Senão, fricione as mãos com preparações alcoólicas!

 Duração de todo o procedimento: 40 a 60 seg



Essas orientações de higiene do manipulador foram estabelecidas, pois os riscos de infecções dos lactentes aumentam quando as mamadeiras e as formulações são manipuladas ou conservadas de forma incorreta. O manipulador das formulações e o ambiente onde são preparadas são definidos como uma forma de contaminação extrínseca das FDL. Os lactentes são os grupos de risco susceptíveis a infecções por micro-organismos. Lactentes com < 1 ano de idade, recém-nascidos e lactentes abaixo dos dois meses de idade são ainda mais vulneráveis. Os riscos mais elevados estão associados aos lactentes prematuros, os de baixo peso (< 2,5 kg) e os lactentes imunocomprometidos. Das infecções de maior ocorrência devido a contaminação alimentar, estão as causadas pelos microorganismos *Enterobacter sakazakii* e *Salmonella* (FAO/WHO, 2006).

Após os manipuladores higienizar suas mãos em lavatório próprio para isso e limparem o ambiente de manipulação, recomenda-se ainda que estes utilizem luvas para preparar as formulações.

✓ Preparo das formulações infantis, armazenamento e transporte:

Os alimentos de uma forma geral podem transmitir micro-organismos e toxinas para os indivíduos e como o leite é a fonte de alimentação dos lactentes, este deve ser preparado sob as condições higiênico-sanitárias ideais. Os mesmos cuidados se devem ter com a qualidade microbiológica da água que será utilizada para este preparo. Os cuidados com a preparação das formulações infantis iniciam desde a manipulação das embalagens BRASIL, 2011.

Quando se separa a matéria-prima, esta deve ser separada por lote de preparo, identificadas com os dados do indivíduo que irá receber a formulação e em seguida retirada a quantidade necessária para o preparo da formulação. Essa quantidade deve ser pesada com precisão e armazenada em embalagens fechadas até o momento da diluição, protegendo assim de variações na temperatura e umidade. A água para diluição deve seguir as recomendações das Portarias 2914 de 2011 (para água filtrada) e RDC 275 de 2005 (para água mineral, cujos pacientes com trato digestório íntegro e imunologicamente saudável) (BRASIL, 2011; BRASIL, 2005). De acordo com a FAO/WHO. (2007), as formulações devem ser diluídas em água a

70°C, a fim de evitar contaminação por micro-organismos. Temperaturas entre 80° e 90°C não são recomendadas por diminuírem o valor nutricional das fórmulas infantis.

As formulações para os lactentes devem ser cuidadosamente selecionadas de acordo com a sua necessidade e cuidados médicos. As embalagens devem ser desinfetadas antes de abertas. O tempo de preparo das formulações infantis também é um fator que contribui para a probabilidade de contaminação. O recomendado é que para ambientes não climatizados, este preparo não exceda o tempo de 30 minutos. Já em ambientes climatizados com ar condicionado, a temperatura deve variar entre 20°C e 24 °C e o tempo de preparo até 90 minutos. A sala também precisa estar com uma umidade entre 50% e 60%. Os utensílios utilizados no preparo devem ser desinfetados e esterilizados como já foi anteriormente citado. Caso as FDL sejam preparadas em copos, não exceda o volume de 1L por preparo. A FAO/OMS concluiu que quando preparadas grandes quantidades das formulações em recipientes maiores (25L), o risco de contaminação por patógenos é aumentado. Sendo assim, sempre é recomendado o preparo em quantidades menores (FAO/WHO., 2007).

As mamadeiras contendo as formulações já preparadas devem ser armazenadas em refrigerador numa temperatura abaixo de 5°C por até 24 horas. O monitoramento das preparações deve ser diário. As mamadeiras não podem passar mais que duas horas a temperatura ambiente mais quente (30°C a 35°C), pois estimula a proliferação de microorganismos. Mesmo que as formulações infantis tenham sido preparadas com água a temperatura igual ou superior a 70°C, para reconstituir a FDL, esse tempo de exposição não pode ser excedido, pois a 70° C os esporos de bactérias perigosas ainda podem ser ativados. Cada instituição contendo lactário necessita ter suas recomendações escritas para o preparo das formulações (FAO/WHO., 2007; ILSI-BRASIL, 2017).

As mamadeiras já prontas também precisam estar rotuladas adequadamente para garantir sua rastreabilidade. As informações podem conter detalhes da fórmula desidratada, nome do lactente, nome de quem preparou, hora e data de preparação. Esse procedimento facilitará o direcionamento das mamadeiras já que em hospitais as formulações são reconstituídas em grandes quantidades (FAO/WHO., 2007; ILSI-BRASIL, 2017).

Quando as mamadeiras são preparadas, estão em temperaturas elevadas e precisam ser resfriadas. O resfriamento pode ser feito em água corrente, porém, o ideal é que seja feito em refrigerador, minimizando os riscos de contaminação. Além do processo de resfriamento favorecer o risco de contaminação por micro-organismos, essas mamadeiras podem necessitar serem transportadas para diferentes áreas no estabelecimento ou serviços. Esse transporte é um potencial risco de desenvolvimento bacteriano e recomenda-se ser feito o mais rápido possível (máximo de 30 minutos). As mamadeiras precisarão ser transportadas em caixas térmicas devidamente desinfetadas caso o tempo de transporte exceda os 30 minutos (FAO/WHO., 2007; ILSI-BRASIL, 2017).

Todo estabelecimento de saúde com serviço neonatal e pediátrico deve obrigatoriamente ter um lactário. Deve existir em Estabelecimentos Assistenciais de Saúde (EAS) em que se utiliza nutrição enteral em sistema aberto (preparado para consumo imediato), uma sala com dimensão mínima de 5 m<sup>2</sup> para a manipulação dessas dietas. Em unidades que houver lactário, os ambientes podem ser compartilhados em condições específicas (BRASIL, 2012).

As especificações de estrutura física de lactário é descrita no quadro 1.

**Quadro 1:** Dimensionamento da área do lactário segundo RDC nº 50 (2002) e RDC nº 307 (2002):

ATIVIDADE	UNIDADE/ AMBIENTE	QUANTIFICAÇÃO MÍNIMA	DIMENSÃO MÍNIMA	INSTALAÇÕES
Receber, higienizar e esterilizar mamadeiras e demais utensílios utilizados.	SALA COMPOSTA DE:	1	8 m <sup>2</sup>	Água fria, água quente e coleta e afastamento de efluentes diferenciados*. As demais instalações vão depender dos equipamentos utilizados.*
	Área para recepção, lavagem de mamadeiras e outros utensílios.			
	Área para desinfecção de alto nível de mamadeiras.	1	4 m <sup>2</sup>	As instalações vão depender dos equipamentos utilizados**.

Fazer o preparo, o envase, rotulagem, esterilização e distribuição de fórmulas lácteas e não lácteas.	SALA COMPOSTA DE:	1	7 m <sup>2</sup>	Água fria, água quente e coleta e afastamento de efluentes diferenciados*. As demais instalações vão depender dos equipamentos utilizados**.
	Área para preparo e envase de fórmulas lácteas e não lácteas			
	Área para estocagem e distribuição de fórmulas lácteas e não lácteas			
Receber, higienizar e esterilizar mamadeiras e demais utensílios utilizados.	Área para esterilização terminal	-	1 m <sup>2</sup>	-
<b>AMBIENTES DE APOIO</b>				
Depósito de material de limpeza, vestiários (barreira para a sala de preparo, envase e estocagem) e sala administrativa				

\*Que necessitem de algum tratamento especial.

\*\* Nesse caso é obrigatória a apresentação do layout da sala com o equipamento.

Essas recomendações são critérios importantes no cuidado com a alimentação dos lactentes e previnem o surgimento de complicações causadas por infecções alimentares e garantindo assim, a segurança alimentar nos lactários hospitalares.

A RDC Nº 63, DE 25 DE NOVEMBRO DE 2011 dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Saúde e possui o objetivo de estabelecer requisitos de Boas Práticas para funcionamento de serviços de saúde, fundamentados na qualificação, na humanização da atenção e gestão, e na redução e controle de riscos aos usuários e meio ambiente. Essa resolução aplica-se a todos os serviços de saúde no país, sejam eles públicos, privados, filantrópicos, civis ou militares, incluindo aqueles que exercem ações de ensino e pesquisa. Alguns pontos importantes: o serviço de saúde deve desenvolver ações no sentido de estabelecer uma política de qualidade envolvendo estrutura, processo e resultado na sua gestão dos serviços; o serviço de saúde deve utilizar a Garantia da Qualidade como ferramenta de

gerenciamento; as Boas Práticas de Funcionamento são os componentes da Garantia da Qualidade que asseguram que os serviços são ofertados com padrões de qualidade adequados e o serviço de saúde deve estabelecer estratégias e ações voltadas para Segurança do Paciente.

#### **2.4. Avaliação microbiológica de formulações lácteas e riscos associados a formulações lácteas contaminadas**

A microbiologia tem sido empregada na ciência dos alimentos para aplicar diferentes testes indicadores com o propósito de identificar micro-organismos presentes nos alimentos, incluindo alimentos infantis, como as fórmulas infantis. Estes testes identificam diversos micro-organismos chamados de organismos indicadores, os quais podem estar presentes devido à exposição dos alimentos a condições inadequadas de armazenamento e manipulação. O comportamento desses organismos indicadores varia a depender da matriz alimentar, do ambiente, do processo de produção industrial e do sistema de distribuição do alimento. Os diferentes tipos de ensaios são então usados para avaliar parâmetros microbiológicos a partir dos testes indicadores que permitam o controle da higiene, podendo ser aplicados às fórmulas infantis (BUCHANAN e ONI, 2012).

De acordo com a legislação brasileira e o que consta na Resolução - RDC Nº 331, de 23 de dezembro de 2019, publicada pelo Ministério da Saúde/ANVISA (ANVISA.. 2019), os procedimentos metodológicos utilizados para se fazer a coleta, acondicionamento, transporte e análise de amostras dos alimentos deve seguir pelo menos uma das referências citadas pelo documento, de acordo com a sua aplicação, como por exemplo, o que prevê a “Organização Internacional de Normalização (International Organization for Standardization - ISO)”, o “Compêndio de Métodos para Análise Microbiológica de Alimentos (Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods - APHA)” ou os “Métodos Padrão para Análise de Produtos Lácteos (Standard Methods for the Examination of Dairy Products - APHA)”. O documento ainda ressalta que a qualquer outro método alternativo pode ser utilizado, desde que validado e que garanta resultados equivalentes aos que são obtidos pelas referências citadas na RDC Nº 331.

Os alimentos podem estar expostos a alguma condição que facilite o risco de contaminação por um determinado patógeno ou aumentar a taxa de proliferação de tal patógeno. Esses patógenos são normalmente caracterizados como organismos indicadores que é um micro-organismo, grupo de microrganismos ou ainda um produto do metabolismo microbiano que é um indicativo de alimentos contaminados (BUCHANAN, 2000; BUCHANAN e ONI, 2012).

As fórmulas desidratadas infantis (FDI) por serem produzidas em processo industrial não são consideradas estéreis e são passíveis de conter micro-organismos devido ao processo de manipulação. Considerando este fator, tem se identificado, por exemplo, a contaminação de FDI por microorganismos de origem bacteriana, os quais oferecem riscos à saúde dos lactentes (PALCICH *et al.*, 2009; SANI e YI., 2011). Considera-se também um fator agravante para contaminação de FDI, o fato de que essas fórmulas desidratadas precisarem ser reconstituídas nos lactários hospitalares, estando sob cuidados dos manipuladores (OLIVIERA *et al.*, 2000).

O avanço tecnológico e conhecimento sobre os micro-organismos presentes no leite e produtos laticínios possibilitou identificar melhor os patógenos que até então não eram bem reconhecidos no início do século XX (BOOR *et al.*, 2017). Diversos organismos indicadores têm sido usados para descrever condições de segurança alimentar. Dentre esses indicadores, se destacam os Coliformes, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Enterococcus spp.*, *S. entérica*, *B. cereus*. Outros menos comuns, como *Listeria spp.* e *Clostridium perfringens*, também são encontrados em alimentos. Os métodos utilizados para detecção de indicadores precisam atender uma grande demanda e estar disponíveis facilmente e por isso precisam ser rápidos, baratos e de fácil interpretação (BUCHANAN e ONI, 2012).

Em dezembro de 2019, a ANVISA atualizou os novos padrões microbiológicos para alimentos. Esses padrões estão descritos na RDC Nº 331, que trata dos requisitos gerais para a aplicação dos padrões microbiológicos, que estão estabelecidos na Instrução Normativa Nº 60 (ANVISA., 2019). Vale salientar, que no vigente trabalho, todas as análises foram realizadas utilizando a RESOLUÇÃO-RDC Nº 12, DE 2 DE JANEIRO DE 2001 (Quadro 1).

Considerando o tipo de micro-organismo que pode estar presente em FDI, laticínios e os micro-organismos derivados de contaminação humana, microrganismos como Coliformes, *S. aureus*, *B. cereus* e *Salmonella* tem sido descrito em trabalhos relacionados com a temática (FRIEDMAN, 2017; HENRY e FOULADKHAH, 2019; EHUWA, JAISWAL e JAISWAL, 2021).

Coliformes são indicadores de contaminação fecal e usados em saneamento geral. Esses micro-organismos podem ser identificados como coliformes totais e coliformes fecais (coliformes fecais, termotolerantes), quando há abuso de temperatura, e são capazes de fermentar lactose produzindo gás. Coliformes, de maneira geral, são bactérias encontradas no trato gastrointestinal de humanos e outros animais que possuem sangue quente. Esses micro-organismos se reproduzem entre 24h e 48h, sendo que coliformes totais prevalecem a 35°C enquanto coliformes termotolerantes se reproduzem favoravelmente a 45°C. Esse último fornece nos alimentos, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação de eventual contaminação por enteropatógenos, uma vez que coliformes podem ser destruídos pelo calor, sendo útil em testes de contaminação pós-processamento. Coliformes é um grupo que possui espécies de gêneros diferentes, que inclui *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* e *E. coli*. Métodos de detecção mais específicos estão sendo utilizados e o grupo mais abrangente das *Enterobacteriaceae* tem sido utilizado como indicador de patógenos entéricos (FRANCO e LANDGRAF, 2005; FORSYTHE, 2013).

**Quadro 2 – Padrões microbiológicos para alimentos.**

ALIMENTOS INFANTIS					
CATEGORIAS ESPECÍFICAS	MICRO-ORGANISMO/TOXINA/METABÓLITO	n*	c**	m***	M****
A) Fórmulas infantis em pó para lactentes (até seis meses de idade), fórmulas infantis destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, fórmulas de nutrientes	<i>Salmonella/25g</i>	60	0	Aus	-
	<i>Cronobacter spp/10g</i>	30	0	Aus	-
	<i>Bacillus cereus presuntivo/g</i>	5	1	50	5x10 <sup>2</sup>
	Apresentadas ou indicadas para recém-nascidos de alto risco e outros alimentos especialmente formulados para lactentes				
	Enterobacteriaceae/10g	10	0	Aus	-
	Aeróbios mesófilos/g	5	2	5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>3</sup>
B) Fórmulas infantis em pó de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância e outros alimentos especialmente formulados para lactentes e crianças de primeira infância	<i>Salmonella/25g</i>	60	0	Aus	-
	<i>Bacillus cereus presuntivo/g</i>	5	1	50	5x10 <sup>2</sup>
	Enterobacteriaceae/10g	5	0	Aus	-
	Aeróbios mesófilos/g	5	2	5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>3</sup>

\*Unidades amostrais a serem coletadas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente (n);

\*\*Tamanho da unidade analítica e a indicação do número de unidades amostrais toleradas com qualidade intermediária (c);

\*\*\* Limite microbiológico m (m): limite que, em um plano de três classes, separa unidades amostrais de "Qualidade Aceitável" daquelas de "Qualidade Intermediária" e que, em um plano de duas classes, separa unidades amostrais de "Qualidade Aceitável" daquelas de "Qualidade Inaceitável";

\*\*\*\*Limite microbiológico M (M): limite que, em um plano de três classes, separa unidades amostrais de "Qualidade Intermediária" daquelas de "Qualidade Inaceitável";

Aus = Ausência.

As Enterobacteriaceae tem sido utilizada como um indicador de contaminação fecal e tem sido detectada em fórmulas infantis. Enterobactérias podem ser responsáveis por infecções em crianças e adultos (FRIEDEMANN, 2007; PROUDY, 2009). Dos muitos gêneros pertencentes às Enterobacteriaceae, pode-se destacar os que fermentam lactose, como a *E. coli* e os que não fermentam, como a *Salmonella*. Quanto às análises para detecção dos microrganismos, recomenda-se o uso de ágar bile vermelho-violeta com glicose para as enterobactérias, enquanto o ágar bile vermelho-violeta com lactose é mais adequado para coliformes (FRANCO e LANDGRAF, 2005; FORSYTHE, 2013).

Uma das grandes preocupações com a contaminação de lactentes por micro-organismos patogênicos se refere a incapacidade de o sistema imune desses indivíduos agirem de forma eficiente no combate à infecção. Isso ocorre porque nessa fase da vida, diversos sistemas, incluindo o sistema imune, ainda não estão maturados e, portanto, lactentes são susceptíveis a doenças de foro infeccioso. Essas infecções não dependem apenas da presença do patógeno nas formulações lácteas, mas principalmente das endotoxinas produzidas pela superfície das bactérias Gram negativas, que permanecem nos alimentos mesmo após passar por forte instabilidade térmica (TOROW *et al.*, 2017; WU, H. *et al.*, 2021).

Endotoxinas como a porção Lipídio A presente nos lipopolissacarídeos da membrana de bactérias (por exemplo, *E. coli*, presente no trato intestinal) pode gerar diferentes sinalizações imunológicas e com isso causar diferentes respostas patológicas como febre, hipotensão e choque séptico (SCHROMM *et al.*, 2000; FUKU *et al.*, 2019). Ainda não se tem um limite definido para a concentração permitida de endotoxinas em fórmulas infantis, no entanto as pesquisas são importantes para definir em que ponto a presença das endotoxinas apresentam um perigo real para os lactentes. Além disso, é importante frisar que algumas moléculas presentes no leite, como no leite cru, incluem imunoglobulinas, lactoferrina, fosfatase alcalina e lisozimas, que formam complexos com as endotoxinas, diminuindo o seu potencial tóxico (SIPKA *et al.*, 2015). Como muitos efeitos tóxicos dos micro-organismos podem afetar diretamente o trato intestinal, essa precisa possuir uma boa flora bacteriana que auxilie no seu funcionamento. (WATKINS *et al.*, 2018).

*Salmonella* são bactérias que não formam esporos e possuem características anaeróbicas, fermentando glicose e produzindo ácido e gás. São capazes de se multiplicar em temperaturas que variam de 5°C – 38°C. Pode estar presente em diferentes fontes alimentares, desde carnes e produtos lácteos, mas também já foi identificada em frutas e vegetais (FORSYTHE, 2013; TRABULSI, 2015). *Salmonella* está presente principalmente no trato gastrointestinal de humanos e animais, porém, devido a manipulação de equipamentos devido a modernização industrial, esse gênero pode ser fonte de contaminações cruzadas, envolvendo equipamentos, utensílios e água (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

A *Salmonella* está relacionada com um grande número de infecções em todo o mundo e pode afetar diretamente lactentes dependentes de formulações infantis que podem estar contaminadas.

Yang e colaboradores (2014) relataram a presença dessa bactéria em fórmulas infantis em pó e em outros alimentos infantis, constatando também a resistência dessa bactéria a diferentes antibióticos. Uma grande preocupação com os casos de *Salmonella* chamam a atenção devido a diversos surtos relatados ao longo das décadas. Isso levou à criação de procedimentos de higiene para alimentos infantis, uma vez que há associação de infecção e doenças em bebês e crianças associado a casos de contaminação por *Salmonella*. Isso aumentou ainda mais a preocupação com a qualidade dos alimentos, requisitando investigações microbiológica de fórmulas infantis, como medida de prevenção contra contaminação (TOYOFUKU, KUBOTA e MORIKAWA, 2006; CAHILL et al., 2008; JOURDAN-DA SILVA et al., 2018).

As análises microbiológicas de fórmulas infantis permitem detectar, além da presença de micro-organismos patógenos, como tais micro-organismos estão associados a quadros graves de infecção, uma vez que dependendo do micro-organismos indicador presente nas fórmulas infantis, bem como no leite, o seu metabolismo pode gerar toxinas que expõe a saúde humana à infecções graves (ISHIKAWA et al., 2016).

Outra investigação microbiológica de alimentos se refere a detecção da bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*), uma bactéria de característica anaeróbia que possui vários biotipos. Os testes para detecção se baseiam em testes

bioquímicos e de padrões de resistência. As bactérias do gênero *Staphylococcus* apresentam um perigo à saúde humana devido às endotoxinas que são capazes de produzir. *S. Aureus* pode estar presente em alimentos de origem animal, produtos lácteos, embutidos e pode ser transmitida por manipuladores de alimentos (FORSYTHE, 2013).

*Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva (em forma de cocos), quando presente em alimentos, liberam toxinas gastrointestinais responsáveis pelos grandes surtos mundialmente, causando grande número de morbidade e mortalidade. Essa bactéria causa gastroenterite e estima-se que seja responsável por cerca de 2,8 bilhões de casos de doenças diarreicas a cada ano (BULA-RUDAS, RATHORE e MARAQA, 2015), sendo associada a contaminação infantil por estar presente em fórmulas infantis (CAHILL *et al.*, 2008). *Staphylococcus aureus* está associado a diferentes tipos de complicações. Quando se multiplica em lesões, pode gerar infecções supurativas, com formação de pus. Em infecções sistêmicas, o micro-organismo está associado a choque séptico e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo sistema imune. Também produz a Toxina da Síndrome do Choque Tóxico que leva a síndrome do choque térmico e em alguns casos, *S. aureus* pode levar ao óbito. Quanto aos a toxicidade por alimentos contaminados, essa bactéria ao crescer nos alimentos, produz toxinas super antigênicas denominadas de enterotoxinas estafilocócicas (SEs), e a contaminação pode ocorrer por meio dos manipuladores de alimentos portadores de *S.aureus*. (TRABULSI, 2015).

As toxinas produzidas pelo *S. aureus* causam sintomas de intoxicação mesmo em doses abaixo de 1,0 µg/kg em alimentos contaminados. A contaminação alimentar é uma das causas agudas de intoxicação por esse micro-organismo, gerada por suas endotoxinas. No geral, os sintomas presentes dessa intoxicação são cólicas abdominais, vômito, ânsias e diarreia (FORSYTHE, 2013; CHEUNG, BAE e OTTO, 2021).

Quanto à população infantil afetada, os neonatos e crianças abaixo de 1 ano de vida são as mais afetadas por infecções causadas por *S. aureus*. As infecções podem se dar a diferentes fatores, mas grande parte pode ocorrer na área hospitalar (MCMULLAN *et al.*, 2020). Fórmulas infantis também estão correlacionadas com

alta contaminação de neonatos por essa bactéria e o fato desses neonatos necessitarem ser tratados com antibióticos, causa grande resistência do micro-organismos, aumentando as chances de óbito por complicações infecciosas (PARNANEN *et al.*, 2022).

A contaminação por bactérias pode ser prevenida, quando essas ainda estão em baixas doses. Porém, a sobrevivência dessas bactérias num período de 72h pode levar a re-contaminação de fórmulas infantis (CHO *et al.*, 2019).

A qualidade de higiene em áreas de lactários hospitalares muitas vezes é classificada como boa, mas ainda podem apresentar riscos para os lactentes quando houver algum indício de contaminação por micro-organismos patogênicos. Analisando alimentos e fórmulas desidratadas infantis, WANG *et al.* (2012) identificaram em diversas a presença de *S. aureus* bem como os autores descrevem genes que codificam endotoxinas. O processo de reconstituição de fórmulas desidratadas infantis, na maioria das vezes, é o fator que contribui para a contaminação de bactérias patogênicas, como *B. cereus* e *S. Aureus*, por exemplo (TUDELA *et al.*, 2008).

As fórmulas infantis são ofertadas aos lactentes em mamadeiras e este utensílio usado na amamentação também é apontado como um veículo de contaminação de *S. aureus*, identificada por um método de quantificação do nível de ATP residual, como indicador de sujeira orgânica (REDMOND, GRIFFITH e RILEY, 2009).

O *Bacillus cereus* é um gênero de bactérias formadoras de esporos capazes de metabolizar diversos carboidratos e tem como características serem catalase positivo e oxidase variável. Normalmente são isolados de água, solo, vegetais, leite cru e peixes congelados e nos hospitais, são comumente isolados de água de torneira, soros, nebulizadores, respiradores. Esse micro-organismo pode sobreviver a muitos processos de cocção dos alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2005; TRABULSI, 2015).

O *B. cereus* é tradicionalmente identificado por meio cultura, mas atualmente novas técnicas tem sido empregada na detecção desse micro-organismo patogênico, utilizando técnicas mais sofisticadas de biossensores, imuno sensores e biossensores de DNA (RAMARAO *et al.*, 2020). Em fórmulas lácteas, esse

micro-organismos pode ser isolado e purificado usando protocolos tradicionais e os testes de identificação também inclui métodos automatizados, bem como o uso de teste de sensibilidade a diferentes antibióticos, que é uma forma de também verificar a resistência do patógeno (ALANBER, ALHARBI e KHALED, 2020).

O micro-organismo *Bacillus cereus* afeta pessoas em todo o mundo causando surtos de contaminação alimentar, chegando a ser responsável por 1,4% - 12% dos surtos mundialmente. *B. cereus* pode causar dois tipos de doenças gastrointestinais. Uma delas, a doença emética, causa vômitos e os sintomas são muito semelhantes aos causados pelas endotoxinas produzidas pelo *S. aureus*. A outra complicação causa diarreia e cólicas abdominais. O *B. cereus*, pode causar infecção quando presente em concentrações que variam de  $10^5 - 10^8$  UFC/g e de  $10^4 - 10^9$  UFC/g. Baixos níveis nos alimentos ( $<10^2$  UFC/g), são considerados aceitáveis e o principal mecanismo de controle é prevenir da germinação de endósporos e sua multiplicação em alimentos cozidos prontos para consumo, conservando alimentos abaixo de 10°C (FORSYTHE, 2013; DIETRICH *et al.*, 2021).

Os endósporos podem ser formados a partir de *Bacillus*, mas também de *Clostridium botulinum*. Esse bastonete Gram-positivo é responsável por desenvolver a doença conhecida como botulismo. A causa da doença é a ingestão de causada pela ingestão de neurotoxinas pré-formadas. Os sintomas da doença são mais brandos em casos infantis do que em adultos. Em bebês causam a síndrome do “bebê mole”. A ação das toxinas nos neurônios periféricos causam diversos sintomas, desde náuseas, vômitos, dores de cabeça e visão turva à perda de rigidez muscular, podendo levar à morte (FORSYTHE, 2013). Estocagem de alimentos abaixo de 3°C é uma forma de controlar a multiplicação desse micro-organismo. Endósporos de *B. cereus* e *Clostridium* estão presentes no solo, fezes, alimentos, equipamentos que manipulam leite, e também tem sido detectado em laticínios em pó. Os processos industriais são uma grande contribuição para este tipo de contaminação (MCHUGH *et al.*, 2017).

O fato de as fórmulas desidratadas infantis não serem estéreis requer grande atenção em seu preparo. As fórmulas lácteas conferem um ambiente propício para o crescimento bacteriano, podendo algumas precauções serem tomadas minimizando as chances de contaminar os lactentes. O preparo fresco das

formulações e o rápido consumo é uma das medidas que podem ser adotadas (AGOSTONI *et al.*, 2004). No entanto, é preciso que tanto o ambiente de preparo (lactários), quanto utensílios usados e os manipuladores, estejam de acordo com as normas de higiene. Os hospitais também precisam determinar os procedimentos para orientar os funcionários quanto a maneira ideal de higiene e preparo das formulações, com o intuito de prevenir possíveis quadros infecciosos. Métodos mais precisos de detecção de micro-organismos também podem auxiliar a identificar o patógeno e a diagnosticar patologias associadas a infecções por micro-organismos (KENT *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2018).

Os micro-organismos patogênicos que podem estar presentes nos alimentos, e nas fórmulas infantis, já que são de grande importância para este trabalho, variam a depender das condições favoráveis para sua multiplicação. Os alimentos podem transmitir doenças ainda que pareçam normais, ou tenham odor e sabor normal e os organismos que causam doenças transmitidas por esses alimentos contaminados podem gerar tanto um quadro infeccioso quanto um quadro intoxicante. Por essa razão, se ressalta os cuidados que se pode e se deve ter ao preparar a alimentação dos lactentes a partir de fórmulas infantis manipuladas nos lactários dos hospitais. Essa população específica é bastante vulnerável e são mais susceptíveis a adquirir doenças por ingestão de alimentos contaminados.

A contaminação dessas fórmulas infantis pode ocorrer em algum ponto do seu processo de fabricação, portanto para diminuir ou eliminar os riscos, as indústrias aplicam o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que identifica os prováveis perigos e estabelece procedimentos para eliminá-los ou diminuí-los a um nível aceitável durante toda a produção. Contudo, as fórmulas infantis também estão expostas a fatores extrínsecos de contaminação, que podem ser resultados de uma má manipulação ou utilização de utensílios sujos, como colheres, por ocasião da preparação do alimento (WEFFORT, 2012).

O documento “*Enterobacter sakazakii* e *Salmonella* em fórmula infantil em pó: Avaliação de Risco Microbiológico” da FAO/OMS de 2006 ressalta alguns pontos importantes:

- Uso de água a 70° C para reconstituir fórmulas infantis reduz significativamente o risco. Geralmente, os cenários com maior risco estão associados com

temperaturas de diluição de 40° e 50° C, quando a fórmula não é consumida imediatamente. A reconstituição com líquido a 70° C é uma estratégia efetiva de redução do risco em todos os cenários investigados, ou seja, há manutenção da segurança do produto mesmo em uma temperatura ambiente mais alta, com um intervalo maior entre o preparo e o consumo do produto e um armazenamento em temperatura diferente da ideal.

- Recomenda-se que as fórmulas não sejam mantidas em temperatura ambiente por mais de duas horas, mesmo quando a diluição ocorre em temperatura não inferior a 70°C, tendo em vista a possibilidade de contaminação tanto no preparo quanto durante a alimentação. Conservar as fórmulas em temperaturas inferiores a 5° C prevenirá o desenvolvimento de *Salmonella* e de *E. sakazakii* e diminuir o tempo de espera durante a distribuição e alimentação reduzem consideravelmente o risco de contaminação por *E. sakazakii*.
- Na reconstituição em alta temperatura há perda de nutrientes termossensíveis, risco de queimaduras nos lactentes e nas pessoas que preparam as fórmulas, ativação dos esporos de *B. cereus* ou de outras bactérias e formação de grumos. Quanto à possibilidade de ativação de esporos de *B. cereus*, a FAO/OMS identificou que o consumo imediato da fórmula ou o seu armazenamento adequado minimizam os riscos.

### **3 HIPÓTESE**

Este trabalho visou realizar pesquisas que embasam e quantificam as formulações lácteas utilizadas num lactário hospitalar da cidade de Maceió-AL, mostrando que não estão dentro das condições microbiológicas padrão recomendadas.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral:**

Avaliar a qualidade microbiológica de formulações infantis utilizadas na preparação de mamadeiras em um lactário de Maceió.

### **4.2 Objetivos específicos:**

- Realizar a contagem de coliformes nas formulações lácteas;
- Quantificar o micro-organismo *Bacillus cereus* nas formulações lácteas;
- Verificar nas formulações lácteas a presença ou ausência de *Salmonella spp.*;
- Quantificar o micro-organismo *Staphylococcus* nas diferentes formulações lácteas.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Caracterização do estudo e Amostragem**

Estudo transversal desenvolvido durante os anos de 2015 e 2020, a partir de coletas mensais de 14 formulações (**Quadro 3**) lácteas infantis provindas de um lactário de um hospital de Maceió (Alagoas). No entanto, como as características do produto são similares, não foi realizada distinção entre as mesmas na análise de dados.

No lactário, o preparo do leite era realizado por um profissional qualificado, seguindo as normas de higienização do profissional, bem como da embalagem do produto e da superfície de preparo. As mamadeiras, os bicos e os anéis foram esterilizados por equipamento adequado ou por fervura em água potável, durante 5 minutos, a 70° C, de acordo com as instruções descritas no produto. Após a higienização do recipiente, o leite foi preparado seguindo as recomendações de cada formulação; a mamadeira foi agitada para diluição do produto.

Foram seguidas as devidas recomendações para a colheita de amostras para análises microbiológicas de alimentos (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2017). As amostras (100 mL) de cada tipo de formulação láctea foram coletadas mensalmente, em condições assépticas, por colaboradores treinados e em seguida transportadas em suas embalagens originais (mamadeiras com capacidade para 150 mL) em caixa de isopor térmico para manutenção das suas características microbiológicas, não ultrapassando o período de uma hora após a sua preparação.

### **5.2 Retirada da unidade analítica**

Antes da retirada das amostras, as mamadeiras foram desinfetadas com álcool a 70%. O material utilizado para a retirada das amostras era estéril e a operação de retirada das amostras foi realizada próximo ao bico de Bunsen. Para retirada da amostra de leite utilizou-se uma pipeta estéril (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2017).

### Quadro 3 – Classificação de cada tipo de leite de acordo com a formulação láctea.

TIPO	DESCRIÇÃO
Fórmula 1	Fórmula infantil para recém-nascidos pré-termo e /ou alto risco. Possui DHA e ARA e nucleotídeos.
Fórmula 2	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 6 meses, possui DHA, ARA; nucleotídeos.
Fórmula 3	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 6 meses, que necessitam de uma fórmula infantil com perfil nutricional mais próximo ao leite materno. Possui DHA e ARA; nucleotídeos.
Fórmula 4	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 6 meses com probióticos.
Fórmula 5	Fórmula infantil para recém-nascidos pré-termo e /ou alto risco com proteínas lácteas. Possui DHA e ARA e probióticos.
Fórmula 6	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 12 meses com risco de alergia alimentar, mais especificamente às proteínas do leite da vaca. Sua fórmula à base de proteínas do soro do leite parcialmente hidrolisada conta com adição de probióticos, ácidos graxos de cadeia longa, nucleotídeos, DHA e ARA.
Fórmula 7	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 6 meses com probióticos (GOS/FOS), DHA e ARA e nucleotídeos.
Fórmula 8	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 6 meses. Possui DHA e ARA, nucleotídeos e probióticos.
Fórmula 9	Fórmula infantil para lactentes de 6 a 12 meses com probióticos.
Fórmula 10	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 6 meses, possui HM-O, 2'-FL e LNnT probióticos, DHA e ARA e nucleotídeos.
Fórmula 11	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 12 meses, destinado a necessidades dietoterápica específica espessada com goma jataí, possui DHA e ARA com taurina, sendo usado como anti regurgitação.
Fórmula 12	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 12 meses, isenta de lactose e destinado ao tratamento da intolerância à lactose e diarreia. Possui DHA, ARA nucleotídeos.
Fórmula 13	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 12 meses, destinada a necessidades dietoterápicas específicas com proteínas extensamente hidrolisadas e com restrição à lactose, possui DHA e ARA e nucleotídeos.
Fórmula 14	Fórmula infantil para lactentes de 0 a 6 meses com probióticos (GOS/FOS), DHA e ARA e nucleotídeos.

DHA = **Ácido docosahexaenóico**; ARA = Ácido araquidônico; GOS = Galacto Oligossacarídeos; FOS = Frutooligossacarídeos; HM-O = Oligossacarídeos do Leite Humano (do inglês "Human Milk Oligosaccharides"); 2'-FL = 2' - Fucosil lactose; LNnT = Lacto-N-neotetraose. As informações das fórmulas podem ser acessadas nos endereços eletrônicos (**ANEXO II**).

### 5.3 Preparo da diluição das amostras

Inicialmente, as amostras foram diluídas (1/10), adicionando assepticamente 25 mL de cada amostra a 225 mL de diluente (água peptonada 0,1% tamponada). A mistura foi homogeneizada gentilmente por alguns minutos e a partir do homogeneizado (diluição  $10^{-1}$ ), foram preparadas diluições sucessivas (até a diluição  $10^{-3}$ ) em frascos contendo 9 mL do diluente, como representado na figura 2.

**Figura 2** - Esquema representativo da preparação de amostra e diluição



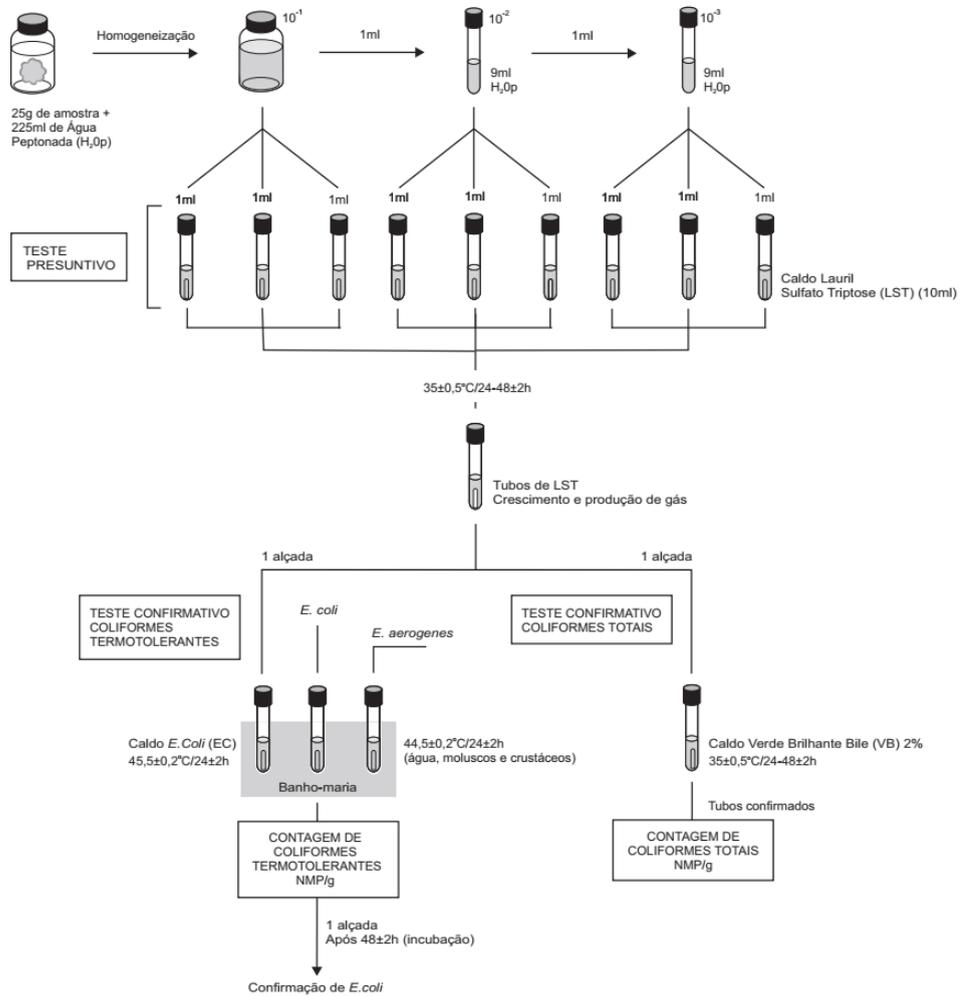
Fonte: SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2017.

Após a homogeneização das diluições, a inoculação nos meios recomendados foi feita no tempo máximo de 15 minutos após o preparo.

### 5.4 Análise de coliformes totais e coliformes a 45 °C

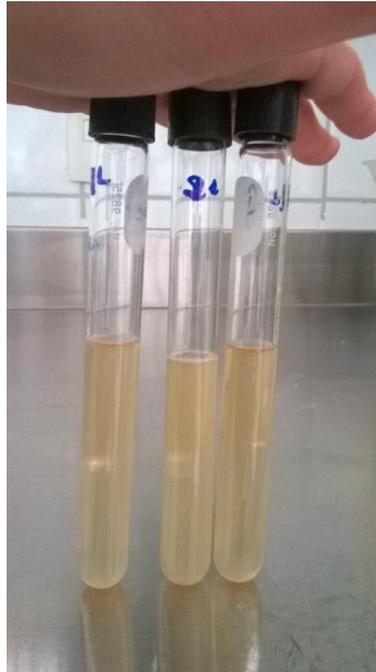
Para a determinação de coliformes totais e termotolerantes (45 °C), foi utilizado o método do Número Mais Provável (NMP), baseado na tabela NMP (KORNACKI, GURTLER e STAWICK, 2015). A determinação (**Fig. 2**) foi realizada em duas fases: um teste presuntivo (suspeito), que se propõe a detectar a presença de micro-organismos e a produção de gás a partir da lactose; e um teste confirmativo. Para o teste presuntivo, 1 mL de cada amostra foi transferido para um tubo de ensaio contendo Lauril Sulfato Triptose (LST) e tubos de Durham. As amostras foram incubadas a 35 °C por 48 horas em estufa bacteriológica e os tubos considerados positivos apresentavam turbidez e produção de gás dentro dos tubos de Durham decorrido o tempo de incubação.

**Figura 3 - Esquema representativo da determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes (45 °C)**



Fonte: SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2017.

**Figura 4** - Teste presuntivo (LST) considerados positivos



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

A partir do tubo positivo de LST, com o auxílio de uma alça de metal, uma alçada foi transferida para um tubo contendo caldo verde brilhante bile (BRILA) para determinação dos coliformes totais. As amostras foram incubadas a 35 °C por 48 horas e considerados tubos positivos os que continham turbidez e gás no interior do tubo de Durham. Para determinação dos coliformes a 45 °C, uma alçada do tubo positivo de caldo BRILA de cada amostra foi transferida para outro tubo contendo caldo *E. coli* (EC). Os tubos foram incubados em banho-maria a 45 °C de 24 – 48 horas. Os tubos positivos apresentavam turbidez e gás no interior dos tubos de Durham. Tanto para a quantificação dos coliformes totais quanto para coliformes a 45 °C foi utilizada a Tabela NMP (**Anexo I**) para calcular o “Número Mais Provável” de coliformes por grama de alimento.

**Figura 5** - Teste confirmativo (EC), com crescimento para coliformes a 45 °C

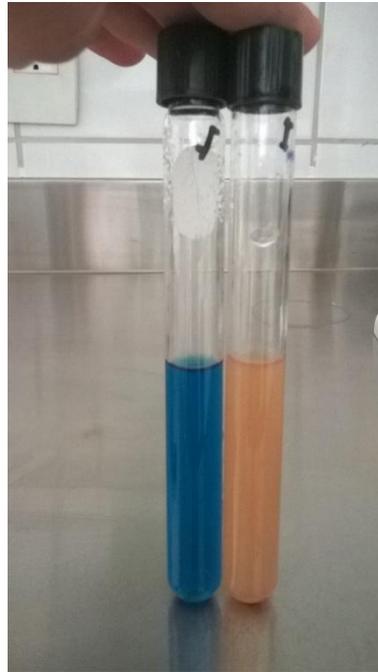


**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

### **5.5 Análise de *Salmonella* spp.**

A determinação da presença de *Salmonella* seguiu as instruções indicadas pela Portaria SDA n°62 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2003). As amostras de cada tipo de leite passaram pelo processo de pré-enriquecimento, 25 mL de leite foi transferido para saco de Stomacher e 225 mL de água peptonada tamponada foi acrescentada. A mistura foi homogeneizada em Stomacher e incubada a 36 °C durante 24 horas. Em seguida, 0,1 mL e 1 mL de cada amostra pré-enriquecida foi transferido para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e 10 mL de caldo Selenito Cistina, respectivamente e incubados a 41 °C em banho-maria por 24 horas para enriquecimento e determinação da *Salmonella*.

**Figura 6** - Selenito e Rapaport após 24 horas no banho-maria



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

O isolamento das colônias foi obtido ao se estriar uma amostra de cada caldo seletivo sobre a superfície seca de placas. Duas placas contendo meio de cultura Ágar BS (Bismuto Sulfito) foram obtidas por inoculação a partir do caldo Rappaport Vassiliadis e outras duas placas contendo meio de cultura Ágar XLD (Xilose Lisina Desoxicolato) foram obtidas por inoculação a partir do caldo Selenito Cistina. As placas, invertidas, foram incubadas a 36 °C durante 24 horas. Foram selecionadas de 3 a 10 colônias suspeitas por amostra, de acordo com as colônias típicas em cada meio de cultivo para os testes bioquímicos descritos a seguir.

**Figura 7** - Estriamento em placas do Selenito e do Rapaport para o meio Ágar BS (Bismuto Sulfito)



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

**Figura 8** - Estriamento em placas do Selenito e do Rapaport para o meio ágar XLD (vermelho).



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

**Figura 9** - Placas em estufa de 36°C onde permaneceram por 24 horas.



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

1. Teste de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI): Com uma agulha de inoculação, inoculou-se cada cultura no ágar por picada profunda e estriamento na superfície inclinada. O meio ágar TSI contém glicose (1,0 g/L), lactose (10,0 g/L) e sacarose (10,0 g/L). A maioria das *Salmonellas* não são capazes de fermentar a sacarose e a lactose e por isso o meio não é alterado. No entanto, a glicose, que está em baixa concentração, é rapidamente fermentada anaerobiamente. A fermentação da glicose deixa o meio ácido no fundo do tubo, pela viragem do indicador vermelho de fenol, causando o amarelamento do meio. Quando a glicose é esgotada, o substrato proteico de meio é degradado aerobiamente pela *Salmonella* e a produção de amoníaco (NH<sub>3</sub>) confere ao meio um pH alcalino, que modifica a coloração do bisel para rosa intenso. A incubação dos tubos foi feita a 36 °C durante 18-24 horas, observando se houve ocorrência de reação típica de *Salmonella*.
2. Descarboxilação da lisina: A inoculação foi feita por picada profunda em Ágar Lisina Ferro (LIA), estriando na superfície inclinada. Em seguida, o tubo inoculado foi incubado a 36 °C durante 24-30 horas, observando a ocorrência de descarboxilação da lisina por alcalinização do meio (viragem do indicador púrpura de bromocresol, de amarelo (negativo) para violeta (positivo). Com exceção da *Salmonella paratyphi A* e alguns outros sorovares, a maioria das salmonelas são lisina-positivas.
3. Meio Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) e Produção de Indol: O teste de motilidade foi feito ao se inocular o meio SIM com picada no centro do meio de cultura e posterior incubação a 36 °C, de 24-30 horas. A difusão do crescimento por

todo o meio indica motilidade e caso for restrito à linha de semeadura, indica que o micro-organismo é imóvel. Assim, a maioria das salmonelas apresentam motilidade positiva. Grande parte das salmonelas também produzem o gás incolor sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), que ao reagir com o citrato de ferro e amônio presente no meio, forma um precipitado negro insolúvel, indicando a presença do micro-organismo. Após teste de motilidade e produção de H<sub>2</sub>S, foram adicionadas aos tubos algumas gotas do reativo de Kovacs (cor amarelado), para verificar a produção de indol, derivado da oxidação do triptofano presente no meio SIM. A formação de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura indica que o teste é positivo.

Os resultados foram expressos por “presença” ou “ausência” de *Salmonella spp.* em 25 mL do leite, de acordo com a legislação brasileira que determina ser impróprio para consumo, qualquer alimento que contenha pelo menos uma colônia de *Salmonella spp.* em 25 g de qualquer alimento (ANVISA, 2011).

### **5.6 Análise de *Bacillus cereus***

Para determinar a presença de *Bacillus cereus*, as amostras de leite foram diluídas (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>) (**Fig. 10**) e inoculou-se 0,1 mL de cada diluição em placas de Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP) (**Fig. 11**). 1,0 mL da diluição 10<sup>-1</sup> foi inoculada, distribuindo o volume de 0,3 mL em três placas de MYP e 0,1 mL em uma quarta placa. O inóculo foi espalhado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 30 °C durante 24 horas (**Fig 12**) Posteriormente, as colônias presuntivas (5 por placa) foram selecionadas e isoladas em tubo contendo Ágar Nutriente inclinado, incubando-se nas condições anteriores. Em seguida, foram realizados os seguintes testes bioquímicos:

**Figura 10** - Diluições usadas para a análise -  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ .



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

**Figura 11** - Estriamento da placa de MYP usada para análise de *Bacillus Cereus*.



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

**Figura 12** - Placas (do meio MYP já com as diluições da análise do leite) em estufa de 30°C.



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

1. Teste de redução de nitrato: Uma alçada com inóculo da cultura foi transferida para tubos contendo Caldo Nitrato e incubados a 35 °C durante 24 horas. Decorrido esse tempo, 1,0 mL da cultura foi adicionado em um tubo estéril, adicionando 0,25 mL de diferentes reagentes (solução 0,8% de ácido sulfanílico; solução 0,5% de  $\alpha$ -naftol). A confirmação de cepas de *Bacillus cereus* foram confirmadas quando houve mudança de cor do meio para rosa avermelhado em no máximo dez minutos, indicando teste positivo. A maioria das cepas de *B. cereus* são nitrato-positivas.
2. Teste de motilidade: O teste foi realizado inoculando tubos de Ágar Motilidade para *B. cereus*, por picada no fundo do tubo e incubando os tubos a 35 °C durante 24 horas. A migração das células para a região fora da linha de incubação foi classificada como motilidade positiva e quando o crescimento se restringiu a linha de inoculação como motilidade negativa.
3. Teste de Voges-Proskauer (VP) modificado: Uma alçada com inóculo leve da cultura foi inoculada em tubos contendo Caldo VP Modificado para Bacillus, incubando-se posteriormente a 35 °C durante 48 horas. Após o período de incubação, 1,0 mL da cultura (VM-VP) foi transferido para um tubo estéril, acrescentando ao tubo 0,6 mL de solução de 5% de  $\alpha$ -naftol e em seguida o tubo foi agitado. 0,2 mL de solução de KOH (40%) foi adicionado e durante 1 hora observou se houve mudança na coloração do meio para rosa ou vermelho (teste positivo). O número de *Bacillus cereus* foi calculado multiplicando o número de colônias confirmadas nas provas confirmativas pelo fator de diluição.

Os resultados (**Quadro 4**) foram expressos em Unidade Formadora de Colônia/grama ou mL (UFC/g ou mL).

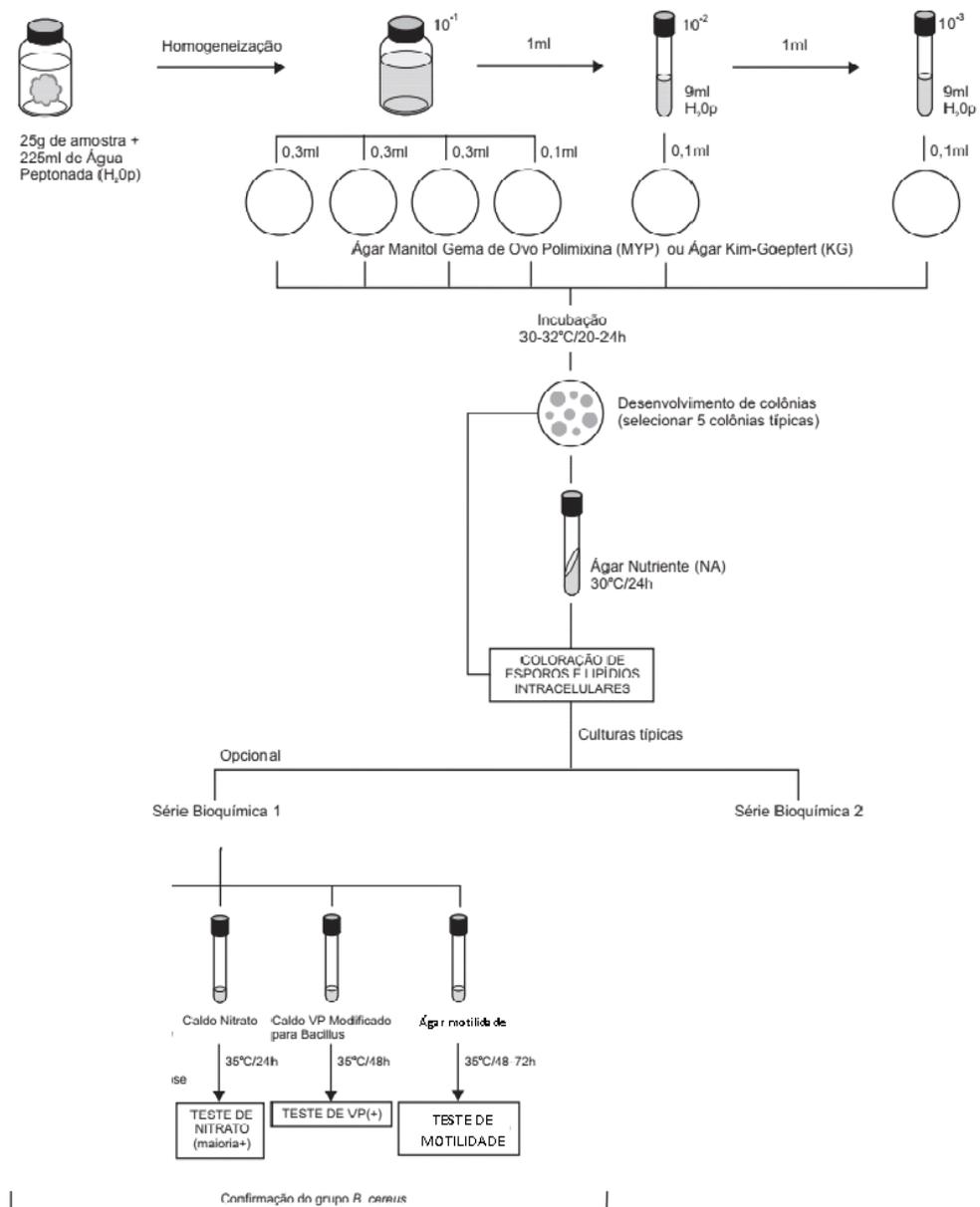
**Quadro 4 – Exemplo para calcular os resultados em UFC/g**

Diluição $10^{-1}$ Colônias típicas: 6
Colônias submetidas à confirmação: 6
Colônias confirmadas (50% = 50/100 = 0,5): 3
$UFC/g = 6 \times 10^{1*} \times 10^{**} \times 0,5 = 3,0 \times 10^{-2}$

\*O inverso da diluição, ou seja, a diluição positiva.

\*\*Referente à diluição, pois inoculou-se 0,1 então multiplica por 10.

**Figura 13** - Esquema representativo de análise para contagem de *B. cereus* por plaqueamento direto.



**Fonte:** Adaptado de (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2017).

### 5.7 Análise de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva

As amostras de leite foram diluídas em saco de Stomacher, como descrito anteriormente, para em seguida realizar a diluição seriada (10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>) das amostras. (Fig. 14) A partir da primeira diluição, 1 mL de cada amostra foi inoculada

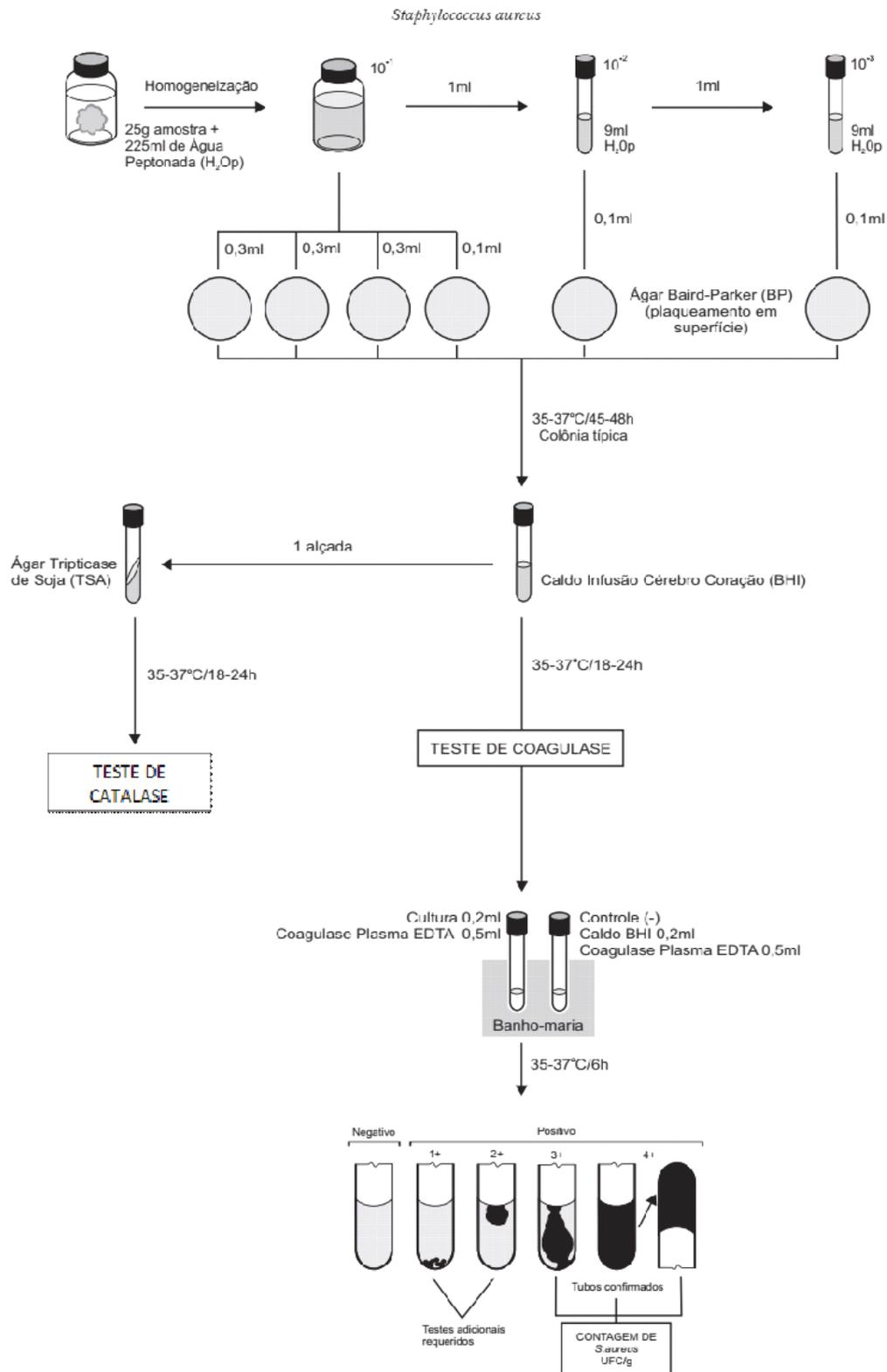
na superfície de placas Ágar Baird – Parker (BP) e o volume distribuído em quatro placas, três contendo 0,3 mL e uma contendo 0,1 mL (**Fig 15**). Para as outras diluições, ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), inoculou-se 0,1 mL da amostra, espalhando sobre as placas com uma alça de Drigalski. Após secagem das placas, as mesmas foram incubadas a 35 °C durante 48 horas (**Fig 16**) selecionando para contagem as placas que continham 20 a 200 colônias de *Staphylococcus aureus*, exceto nos casos em que as colônias típicas estiveram presentes em placas mais cheias. Cinco colônias típicas foram selecionadas para o teste de coagulase transferindo-se cada colônia para tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI, Brain Heart Infusion). Uma alçada de cada tubo BHI foi transferida para tubos Ágar Trypticase de Soja (TSA) inclinados, incubando os mesmos a 35 °C entre 18-24 horas. Os seguintes testes bioquímicos foram realizados:

1. Teste de coagulase: 0,2 mL de BHI foram transferidos para tubos estéreis de 10x10mm, emulsionando fortemente e adicionando 0,5 mL de coagulase plasma de coelho – EDTA. Os tubos foram agitados gentilmente com movimentos circulares e incubados a  $35 \text{ }^{\circ} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os tubos foram monitorados durante 6 horas para verificação da formação de coágulo firme que não se rompe quando o tubo é inclinado ou invertido, considerando assim, o teste positivo para *Staphylococcus aureus*.

2. Teste de catalase: O teste de catalase é realizado ao se adicionar gotas de peróxido de hidrogênio 3% aos tubos de TSA inclinados. A formação de bolhas, decorrente da atividade da enzima, caracteriza o teste como positivo. As cepas de *Staphylococcus aureus* são catalase-positivas.

Os resultados (**Quadro 3**) foram expressos como UFC/g ou mL, em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

**Figura 14** - Esquema representativo de análise de *S. aureus* pelo método de contagem direta em placas.



**Fonte:** Adaptado de (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2017).

**Figura 15** - Estriamento da placa de BP usada para análise de *S. Coagulase*  
*Positivo*



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

**Figura 16** - Placas (do meio BP já com as diluições da análise de leite) em estufa de 36°C.



**Fonte:** Própria autora, laboratório de controle de qualidade de alimentos, 2015.

### **5.8 Análise dos dados**

A análise dos dados obtidos foi realizada ao comparar os resultados com os valores preconizados pela RDC nº 12, de 12 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2011). Os dados também foram descritos como porcentagem, em função do número total de amostras analisadas ou amostras analisadas por ano e quando possível, descritos

os valores mínimos e máximos encontrados. Os gráficos foram editados no Microsoft Office Excel para Windows.

**Quadro 4 – Padrões microbiológicos para alimentos, considerando a importância de compatibilizar a legislação nacional com regulamentos, relacionados aos critérios e padrões microbiológicos para alimentos**

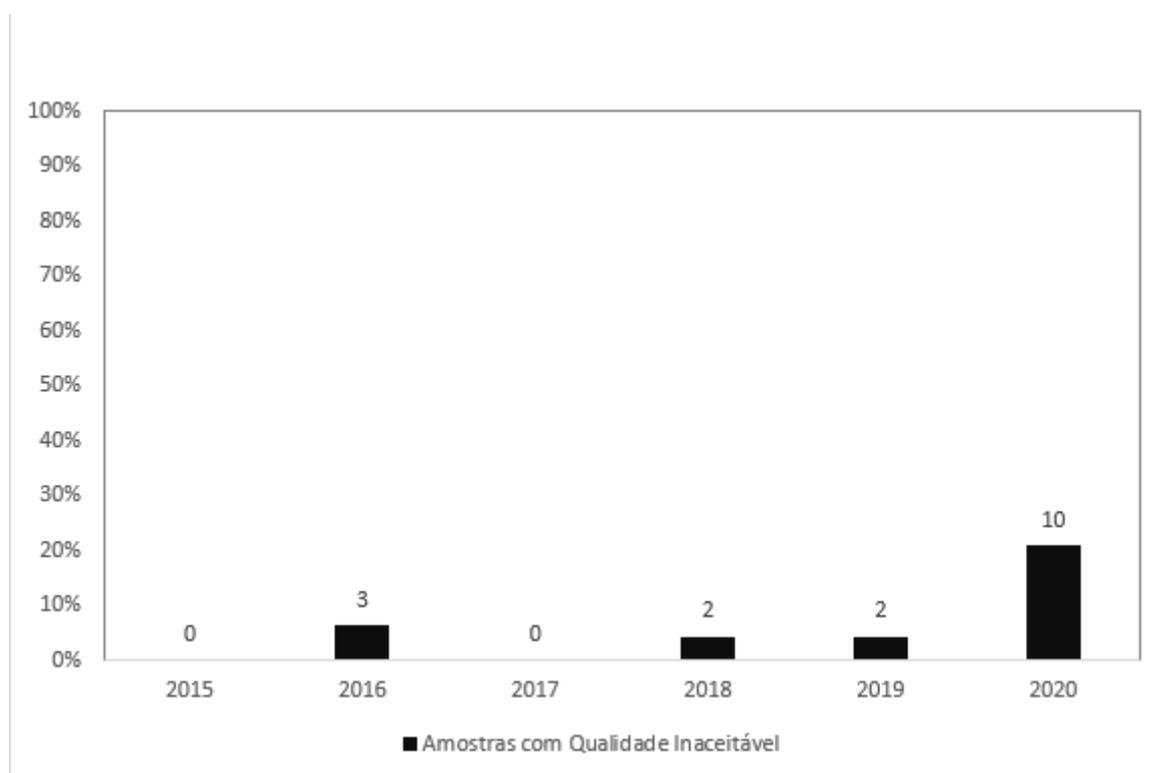
ALIMENTOS INFANTIS	MICROORGANISMO	TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA INICIATIVA	TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA REPRESENTATIVA			
			n	c	m	M
Produtos prontos ou instantâneos que serão consumidos com ou sem adição de líquidos, por bebês de até 1 ano de idade, a exceção dos prematuros, incluindo as fórmulas infantis, exceto os que receberam tratamento térmico em embalagens herméticas.	<i>Coliformes a 35°C/g (mL)</i>	10	5	2	<3	10
	<i>Coliformes a 45°C/g (mL)</i>	Ausência	5	0	Aus	-
	<i>Estaf.coag.positiva/g (mL)</i>	Ausência	5	0	Aus	-
	<i>B.cereus/g (mL)</i>	10 <sup>2</sup>	5	1	10	10 <sup>2</sup>
	<i>Salmonella sp/25g (mL)</i>	Ausência	10	0	Aus	-

Fonte: RDC N° 12 determinada pela ANVISA (2001)

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção dos resultados apresentados neste trabalho, foram analisadas 288 amostras de leite coletadas entre os anos de 2015 e 2020. Das amostras analisadas, 17 estavam em desacordo com os padrões microbiológicos (figura 17) para alimentos, preconizados na RDC N° 12 determinada pela ANVISA (2001).

**Figura 17** - Amostras em desacordo com a Legislação, de acordo com cada microrganismo considerando os anos de 2015 à 2020.



Fonte: ANVISA, 2001.

A seguir serão apresentados os dados para cada parâmetro microbiológico.

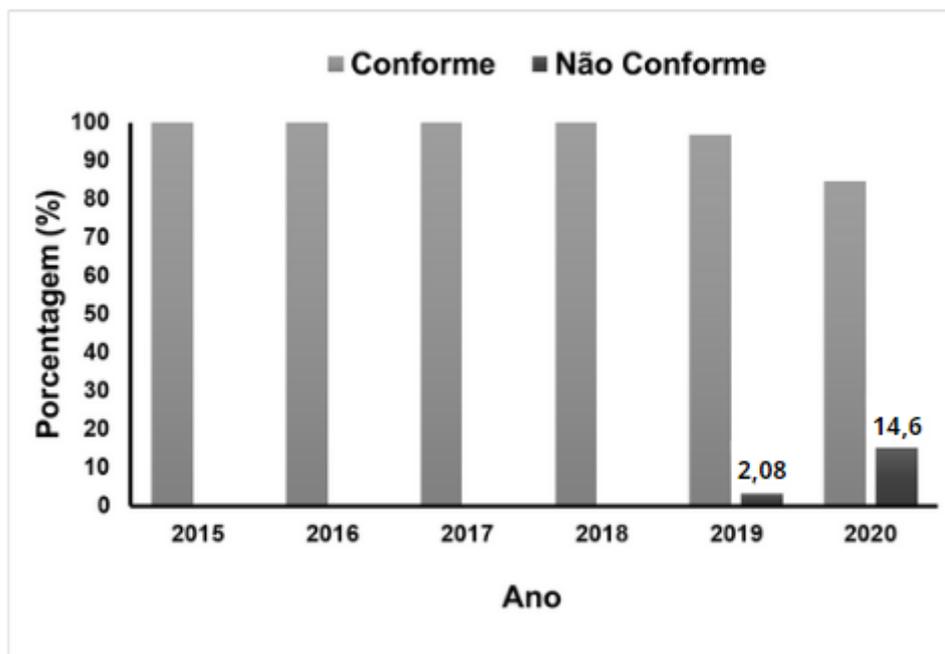
### 6.1 Avaliação de Coliformes totais e coliformes termotolerantes (45 °C)

Nos anos de 2015 a 2018 não foi observado presença de coliformes totais, no entanto, nos anos de 2019 e 2020 foi observado a presença do mesmo. Isso indica

que, considerando o total de amostras avaliados neste estudo (n=288), 2,7 % (n=8) apresentou amostras não conformes, enquanto 97,3% (n=280) apresentou amostras dentro dos padrões higiênicos sanitários.

Levando em consideração cada ano (**Figura 18**), foi possível observar uma que no ano de 2019, 2,08% (n=1) das amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação brasileira para o parâmetro coliformes totais. Em 2020 esse percentual foi de 14,6 % (n=7)

**Figura 18** - Percentual de adequação para contagem de Coliformes Totais em formulações infantis utilizadas na preparação de mamadeiras em um lactário de Maceió, durante os anos de 2015 a 2020.



**Fonte:** Própria autora, 2020.

Quanto aos coliformes termotolerantes, apenas uma amostra, no ano de 2020, foi detectada a presença desse micro-organismo à 45 °C.

A presença de coliformes totais e termotolerantes pode ser consequência de diferentes fatores associados à manipulação das formulações ou ao ambiente em que tais formulações são preparadas. A contaminação por coliformes pode ocorrer

por meio da água utilizada para enxágue de equipamentos, como homogeneizadores, ou por inadequação da estrutura física e organizacional do local de preparo nos hospitais (MAURÍCIO *et al.*, 2017). Condições inadequadas favorecem o crescimento bacteriológico em ambientes e no caso de lactários, pode ser a causa direta da contaminação das formulações preparadas nesses ambientes cujas condições sanitárias não são adequadas (BARROS e ANTÔNIO, 1997).

Em algumas amostras foram detectados coliformes totais e termotolerantes. A depender do ano em que as amostras foram coletadas, houve ausência de coliformes, o que pode indicar que alguns cuidados em determinados períodos foram mais rigorosos.

Coliformes ausentes em alimentos é um indicativo de que este alimento está próprio para consumo, porém, utensílios usados na preparação das formulações, como colheres, liquidificador ou ainda utensílios de plástico, que venham a estar contaminados, oferecem risco a saúde dos lactentes (MOMESSO *et al.*, 2016).

## **6.2 Avaliação da presença de *Salmonella* spp.**

Para a avaliação da *Salmonella*, foi possível observar que não houve contaminação das formulações por esse micro-organismo, uma vez que o mesmo esteve 100% ausente em todas as amostras coletadas entre 2015 e 2020. Esses resultados indicam que as medidas sanitárias adotadas foram bastante eficientes no controle de contaminação contra a *Salmonella* spp. e as formulações dentro dos padrões microbiológicos.

Corroborando com esse resultado, MAURÍCIO *et al.* (2017) também não encontraram a presença de *Salmonella* spp. nas formulações preparadas em lactário hospitalar. Por outro lado, esse microrganismo tem sido detectado em formulações, assim como tem sido identificado em crianças abaixo de 1 ano de idade, indicando o consumo de formulações contaminadas (JONES *et al.*, 2019).

Uma das estratégias para se evitar a contaminação por *Salmonella*, é que as formulações sejam preparadas com água a altas temperaturas, a partir dos 70 °C. Isso evita que ocorra o crescimento de microrganismos nas formulações lácteas (FAO/WHO, 2007; LOSIO *et al.*, 2018). Tanto a temperatura quanto o tempo de

permanência da amostra a determinada temperatura pode influenciar no crescimento bacteriano, uma vez que condições adequadas podem prevenir esse crescimento ao causar danos na membrana bacteriana ou desnaturando enzimas e proteínas presentes nos microrganismos (LANG *et al.*, 2018).

É importante destacar que alguns patógenos originados de fontes alimentares podem permanecer no alimento sem se desenvolver em diversas matrizes alimentares. Ainda que permaneçam sem se desenvolver, esses patógenos podem sobreviver por longos períodos, conferindo contaminação alimentar e humana, principalmente a dos lactentes (LIAN *et al.*, 2015). Dessa forma, fórmulas infantis contaminadas com *Salmonella*, por exemplo, podem causar sintomas em infantes, como diarreia e alguns casos levar ao desenvolvimento de infecções graves, como os casos de bacteremia e meningite (CAHILL *et al.*, 2008).

Além disso, casos de infecção por *Salmonella* estão associados a um grande número de internações de crianças hospitalizadas abaixo dos três anos de idade. Essas crianças apresentaram sintomas que incluem vômitos e diarreias. Outra preocupação é que devido às infecções e medicações usadas no combate às infecções, alguns tipos de *Salmonella* podem adquirir resistência a antibióticos, o que dificulta o tratamento dos infectados (WU, L. J. *et al.*, 2021).

### **6.3 Avaliação da presença de *Bacillus cereus***

Dentre as formulações que foram coletadas, foi detectada contagem de de *B. cereus* acima do permitido nos anos de 2016, 2018, 2019 e 2020. O valor mínimo encontrado foi de  $1,0 \times 10^2$  UFC e o máximo  $1,7 \times 10^3$ .

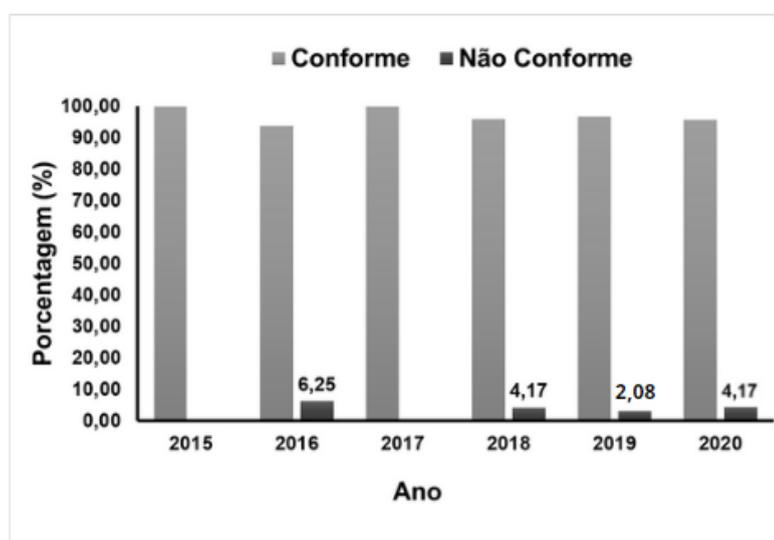
No geral, 97,6% (n=281) das amostras estão de acordo com os padrões microbiológicos para este parâmetro, enquanto 2,4% (n= 7) apresentaram valores acima do permitido.

Os anos de 2015 e 2017, estiveram dentro dos padrões microbiológicos (<10,0 UFC). O *B. cereus* apresentaram contagens acima do permitido em 6,25 % (n=3) das amostras em 2016 e 4,17% (n= 2) em 2018/2020 e 2,08% (n=1) no ano de 2019 (**Fig. 19**). Isso sugere que a forma como as formulações estão sendo manipuladas no lactário, em alguns momentos, pode estar favorecendo a contaminação do leite e do lactente.

O *B. cereus* é um dos microorganismos que também tem sido encontrado em formulações lácteas e está associado a sintomas de infecção, como diarreia. Uma pesquisa realizada por ORGANJI (2015), constatou que o *B. cereus*, além de outros tipos de *Bacillus*, estava presente em diversos produtos, incluindo leite e formulações lácteas infantis. Os isolados foram caracterizados como produtores de endotoxinas e resistentes à penicilina G. Nas fezes de crianças também estava presente o micro-organismo (ZHANG *et al.*, 2017).

*B. cereus* pode causar infecções graves em crianças. Raramente ocorre infecção no sistema nervoso central, mas os casos de mortalidade são elevados. Adicionalmente, infecção no sistema nervoso central em neonatos pode ser causada por agravo de meningite aguda, durante dois meses, e essa infecção parece estar associado ao *B. cereus*, ainda que não se saiba a fonte desse micro-organismo (HORII *et al.*, 2012). Isso fortalece ainda mais as medidas de cuidados que se deve ter em lactários hospitalares, com o intuito de prevenir quadros infecciosos nos lactentes que dependem de formulações lácteas que passam por manipulação.

**Figura 19** - Contaminação por *Bacillus cereus* em formulações infantis utilizadas na preparação de mamadeiras em um lactário de Maceió, durante os anos de 2015 a 2020.



**Fonte:** Própria autora, 2020.

Outros estudos também corroboram com os resultados desse trabalho, ao identificar a presença de *B. cereus* em formulações lácteas infantis (HEINI *et al.*, 2018; PEI, 2018), havendo a possibilidade do fator contaminação estar associado ao ambiente, as vestimentas e mãos não higienizadas adequadamente dos funcionários, o processo de produção e a forma de transporte das formulações (LIU, 2018).

Outro fator que reduz o nível de contaminação das formulações, é a forma de estocagem. Estocar as formulações a temperaturas que variam de 2 a 8 °C pode evitar o crescimento microbiano em fórmulas infantis manipuladas. Mesmo após a diluição das formulações, o crescimento de micro-organismo pode aumentar de 20 a 30 vezes após o preparo, quando em temperatura ambiente (PEREIRA *et al.*, 2013).

#### **6.4 Avaliação da presença de *Staphylococcus coagulase +***

Em relação a presença de *Staphylococcus coagulase +* nas formulações lácteas do hospital estudado, foi verificado que houve uma boa conduta nos padrões de higiene em função de prevenir a contaminação do leite por este micro-organismo, já que todas as amostras estavam dentro dos padrões microbiológicos.

Corroborando com os achados deste trabalho, RODRIGUES (2014) ao investigar formulações lácteas de um lactário, observou ausência de *Staphylococcus aureus* nas formulações. No entanto, ao realizar essa investigação nos funcionários que manipulam as formulações, identificou a presença do microorganismo nas fossas nasais e mãos. A contaminação muitas vezes acontece no processo de abertura das embalagens e preparo do leite, devido à falta de higiene por parte dos manipuladores e das condições inadequadas do lactário, como sugere a autora.

Mello e Rosa (2017), avaliaram nove formulações em um lactário e constataram que apenas duas (22,22%) estavam dentro das recomendações da resolução RDC nº 12 de 2001 da ANVISA. Além de *Staphylococcus* ( $10^2$  UFC/mL), *Salmonella sp*, *Escherichia coli* e *Enterococcus sp* também foram detectados nessas formulações, considerando assim, impróprias para o consumo (MELLO e ROSA, 2017).

Muitas vezes, as formulações lácteas são a maneira pela qual os recém-nascidos ou lactentes e crianças adquirem os nutrientes necessários. Em muitos casos, esses indivíduos estão em processo de recuperação devido a saúde fragilizada e podem não ter um sistema imune eficiente. O preparo das formulações em condições de higiene sanitária adequadas, é capaz de minimizar o risco de contaminação dessa população específica (GALEGO *et al.*, 2017).

Estudos estatísticos da Organização Mundial de Saúde (OMS) comprovaram que mais de 60% dos casos de doenças de origem alimentar são decorrentes do controle higiênico-sanitário de manipuladores inadequado, da não conformidade das técnicas de processamento, da higiene da estrutura física, utensílios e equipamentos deficiente (OMS, 2010).

A contaminação dos alimentos servidos nos hospitais pode ocorrer durante toda a cadeia produtiva, ou seja, desde a produção primária até o consumo e pode resultar da contaminação ambiental, incluindo a poluição da água, ou do ar. A matéria-prima também pode ser uma fonte de contaminação, estando contaminada antes mesmo do recebimento, sendo necessário o controle higiênico sanitário, não apenas nos locais de manipulação, mas também dos fornecedores. (ANVISA, 2006; BRASIL, 2010; OMS, 2010).

Visto que a higiene pessoal e ambiental também é considerada de elevado risco sanitário (WHO, 2006) e suas conformidades no ambiente de manipulação são essenciais para prevenir a contaminação cruzada (WHO, 2015).

## 7 CONCLUSÃO

Os cuidados que se deve ter ao se manipular alimentos em ambiente hospitalar é de extrema importância para preservar a saúde dos indivíduos que estão sob cuidados nessas instalações. Principalmente recém-nascidos que dependem do leite para sua nutrição, e possuem um sistema imune ainda imaturo.

Neste trabalho realizado a partir de coletas de formulações lácteas infantis em um hospital de Maceió-Alagoas, foi possível perceber que apesar da maioria das amostras estarem dentro dos padrões microbiológicos, em alguns momentos houve descuido quanto a manipulação das formulações lácteas, uma vez que foi identificada contagens acima do permitido na legislação vigente de micro-organismos, como os coliformes e *Bacillus cereus*. Este dado sugere que a manipulação inadequada das formulações infantis é a principal causa contaminante das formulações.

A depender do ano em que se foi coletado e do mês, houve uma variação da frequência de formulações contaminadas, o que sugere que nem sempre o ambiente de manipulação ou os responsáveis pela preparação das formulações, estão sob condições de higiene adequadas. Tais dados tornam necessário um reforço adicional às boas práticas de fabricação e validação rigorosa da saúde dos manipuladores.

Esses achados reforçam o quanto o processo de higienização pessoal e ambiental são importantes para se prevenir a contaminação cruzada durante o preparo, manipulação e análise das formulações, tornando indispensável a utilização de processos de higienização padronizados e adequada capacitação dos funcionários.

Os cuidados com os equipamentos utilizados também influenciam na taxa de contaminação do leite que é ofertado aos lactentes, sendo necessário se fazer um acompanhamento microbiológico da água utilizada tanto para lavagem dos utensílios quanto para diluição das formulações lácteas.

Nessa perspectiva, fica claro que o monitoramento microbiológico constante é importante e necessário para reduzir significativamente a frequência e nível de infecções em lactentes, e por isso faz-se necessário estabelecer não só medidas sanitárias, mas educativas que além de evitar a contaminação das formulações

durante o preparo, proporciona uma nutrição adequada para o desenvolvimento desses indivíduos que estão desenvolvendo maturidade imunológica.

## REFERÊNCIAS

AGOSTONI, C. et al. Preparation and handling of powdered infant formula: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 39, n. 4, p. 320-2, Oct 2004.

ALANBER, M. N.; ALHARBI, N. S.; KHALED, J. M. Evaluation of multidrug-resistant Bacillus strains causing public health risks in powdered infant milk formulas. **J Infect Public Health**, v. 13, n. 10, p. 1462-1468, Oct 2020.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). *Pediatria: Prevenção e controle de infecção hospitalar*. Brasília: Editora Anvisa; p. 11-116, 2006.

ANVISA. FÓRMULAS INFANTIS. ANVISA, A.-A. N. D. V. S. Brasília: Anvisa. Gerência-Geral de Alimentos. Gerência de Registro de Alimentos.: 35 p. 2018.

ANVISA. Instrução Normativa N° 60. RDC n° 331, de 23 de dezembro de 2019. SAÚDE, M. D.: Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA 2019.

ANVISA. Resolução - RDC N° 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. ANVISA, M. D. S. A. N. D. V. S.-. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: 96 p. 2019.

ANVISA. **Resolução n.º 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. SAÚDE., M. D. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA: 51 p. p. 2011.

BARROS, L. A. C. Aspectos bacteriológicos de leite produzido e consumido em lactários de hospitais da cidade de Fortaleza. **Rev. RECCS**, v. 9, p. 67-75, 1997.

BOOR, K. J. et al. A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. **J Dairy Sci**, v. 100, n. 12, p. 9933-9951, Dec 2017.

BORDENAVE, G. Louis Pasteur (1822-1895). **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 553-560, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC n. 63, de 6 de julho de 2000. Aprova regulamento técnico que fixa os requisitos mínimos exigidos para a terapia de nutrição enteral. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Diretrizes metodológicas : elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados/ Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2012. 92 pp. (Série A: Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.

BRASIL. **Regulamento de Boas Práticas e de Controle de condições sanitárias e técnicas das atividades relacionadas à importação, exportação, extração, produção, manipulação, beneficiamento, acondicionamento, transporte, armazenamento, distribuição, embalagem, reembalagem, fracionamento, comercialização e uso de alimentos, águas minerais e de fontes, bebidas, aditivos e embalagens para alimentos.** São Paulo: Portaria n. 2619 de 06 de dezembro de 2011. Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo 2011.

BRASIL. **Resolução - RDC n. 50, de 21 de fevereiro de 2002. Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde:** Ministério da Saúde - Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2002.

BRASIL/OPAS/OMS. **Higienização correta das mãos é fundamental para garantir segurança do paciente. Diretrizes da OMS sobre Higienização das Mãos em Serviços de Saúde.**: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) 2016.

BUCHANAN, R. L. Acquisition of microbiological data to enhance food safety. **J Food Prot**, v. 63, n. 6, p. 832-8, Jun 2000.

BUCHANAN, R. L.; ONI, R. Use of microbiological indicators for assessing hygiene controls for the manufacture of powdered infant formula. **J Food Prot**, v. 75, n. 5, p. 989-97, May 2012.

BULA-RUDAS, F. J.; RATHORE, M. H.; MARAQA, N. F. Salmonella Infections in Childhood. **Adv Pediatr**, v. 62, n. 1, p. 29-58, Aug 2015.

CAHILL, S. M. et al. Powdered infant formula as a source of Salmonella infection in infants. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 2, p. 268-73, Jan 15 2008.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia básica.** Recife: EDUFRPE, 2010. 108 ISBN 978-85-7946-020-3.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, Dec 2021.

CHO, T. J. et al. Underestimated Risks of Infantile Infectious Disease from the Caregiver's Typical Handling Practices of Infant Formula. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 9799, Jul 5 2019.

DE SALLES, R. K.; GOULART, R. [Diagnosis of hygienic-sanitary and microbiological conditions of hospital human milk banks]. **Rev Saude Publica**, v. 31, n. 2, p. 131-9, Apr 1997.

DIETRICH, R. et al. The Food Poisoning Toxins of Bacillus cereus. **Toxins (Basel)**, v. 13, n. 2, Jan 28 2021.

EHUWA, O.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices. **Foods**, v. 10, n. 5, Apr 21 2021.

FAO/WHO. **Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Meeting Report. Joint FAO/WHO Technical Meeting on Enterobacter sakazakii and Salmonella Powdered Infant Formula, Rome, Italy, 16-20 January 2006.** Itália: [FAO/WHO] Microbiological Risk Assessment Series. 10 2006.

FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report, Microbiological Risk Assessment Series 10, 2006.

FAO/WHO. Guidelines for the safe preparation, storage and handling of powdered infant formula. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO). Disponível em: : <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif2007/en>: 9-10 p. 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013. 620 ISBN 978-85-363-2706-8.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1ª edição São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 195 ISBN 8573791217.

FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). **Int J Food Microbiol**, v. 116, n. 1, p. 1-10, May 1 2007.

FRIEDMAN, M. Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. **J Agric Food Chem**, v. 65, n. 48, p. 10406-10423, Dec 6 2017.

FUKE, N. et al. Regulation of Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia with Dietary Factors. **Nutrients**, v. 11, n. 10, Sep 23 2019.

GALEGO, D. S. et al. **Lactário nos estabelecimentos assistenciais de saúde e creches**. International Life Sciences Institute do Brasil. Série de Publicações ILSI Brasil: Força-Tarefa Nutrição da Criança. São Paulo. 2017

HEINI, N. et al. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. **Int J Food Microbiol**, v. 283, p. 59-64, Oct 20 2018.

HENRY, M.; FOULADKHAH, A. Outbreak History, Biofilm Formation, and Preventive Measures for Control of *Cronobacter sakazakii* in Infant Formula and Infant Care Settings. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, Mar 12 2019.

HORII, T. et al. *Bacillus cereus* Bloodstream Infection in a Preterm Neonate Complicated by Late Meningitis. **Case Rep Infect Dis**, v. 2012, p. 358789, 2012.

ILSI-BRASIL. **Lactário nos estabelecimentos assistenciais de saúde e creches**. São Paulo: ILSI Brasil-International Life Sciences Institute do Brasil. 4: 52 p. 2017.

ILSI-BRASIL. **Lactário nos estabelecimentos assistenciais de saúde e creches**. São Paulo: ILSI Brasil-International Life Sciences Institute do Brasil. 4: 52 p. 2017.

ISHIKAWA, A. T. et al. Exposure Assessment of Infants to Aflatoxin M(1) through Consumption of Breast Milk and Infant Powdered Milk in Brazil. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 9, Aug 31 2016.

JONES, G. et al. Outbreak of Salmonella enterica serotype Poona in infants linked to persistent Salmonella contamination in an infant formula manufacturing facility, France, August 2018 to February 2019. **Euro Surveill**, v. 24, n. 13, Mar 2019.

JOURDAN-DA SILVA, N. et al. Ongoing nationwide outbreak of Salmonella Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. **Euro Surveill**, v. 23, n. 2, Jan 2018.

KENT, R. M. et al. Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 1217-44, Feb 12 2015.

KORNACKI, J. L.; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. A. Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators. In: (Ed.). **In book: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5<sup>a</sup> edition: American Public Health Association, 2015. cap. 9, p.700 p.

LANG, E. et al. Cellular Injuries in Cronobacter sakazakii CIP 103183T and Salmonella enterica Exposed to Drying and Subsequent Heat Treatment in Milk Powder. **Front Microbiol**, v. 9, p. 475, 2018.

LIAN, F. et al. Survival of Salmonella enteric in skim milk powder with different water activity and water mobility. **Food Control**, v. 47, p. 1-6, 2015.

LIU, Y., GE, W., ZHANG, J., LI, X., WU, X., LI, T., ZHANG, X., & WANG, X. . Detection of Bacillus cereus sensu lato from environments associated with goat milk powdered infant formula production facilities. **International Dairy Journal**, v. 83, p. 10-16, 2018.

LOSIO, M. N. et al. Preparation of Powdered Infant Formula: Could Product's Safety Be Improved? **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 67, n. 4, p. 543-546, Oct 2018.

MAURÍCIO, R. A. et al. Microbiological quality of infant formulations milky handled in hospital. **J Health Sci Inst**, v. 35, n. 2, p. 112-6, 2017.

MCHUGH, A. J. et al. Detection and Enumeration of Spore-Forming Bacteria in Powdered Dairy Products. **Front Microbiol**, v. 8, p. 109, 2017.

MCMULLAN, B. J. et al. Clinical Management of Staphylococcus aureus Bacteremia in Neonates, Children, and Adolescents. **Pediatrics**, v. 146, n. 3, Sep 2020.

McNAB, W.B. A general framework illustrating an approach to quantitative microbial food safety risk assessment. *Journal of Food Protein*, v.6 n.9, p.1216-1228, 1998.

MELLO, B. G.; ROSA, T. R. O. Microbiological assessment of infant formulas sold in Joinville/SC. **Nutrição Brasil**, v. 16, n. 4, p. 219-24, 2017.

MEZOMO, I. F. **Lactário**. In: **MEZOMO, I.F. Serviço de nutrição e dietética**. São Paulo: União Social Camiliana: 115-137 p. 1987.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água: Instrução Normativa SDA - 62**. ANIMAL, D. D. D.: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO 2003.

MOMESSO, N. N. et al. Study of Microbial Contamination in Milk Formula Preparation for Children in a Lactary of a University Hospital in Southern of Minas Gerais Natieli de Natali Momesso State. **Revista Ciências em Saúde** v. 6, n. 3, p. 16, 2016.

MOMESSO, N. N.; LANZIOTTI, R. S.; CAPRONI, P. R. R. Estudo da Contaminação Microbiana no Preparo de Fórmulas Lácteas Infantis em Lactário de um Hospital Universitário do Sul de Minas Gerais / Study of Microbial Contamination in Milk Formula Preparation for Children in a Lactary of a University Hospital in Southern of Minas Gerais State. **Revista Ciências em Saúde** v. 6, n. 3, 2016.

OLIVIERA, M. H. et al. Microbiological quality of reconstituted enteral formulations used in hospitals. **Nutrition**, v. 16, n. 9, p. 729-33, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Food borne disease [internet]. Genebra; 2010 [acesso em 08 mar 2018]. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/159844/9789241507950\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/159844/9789241507950_eng.pdf)

ORGANJI, S. R., ABULREESH, H. H., ELBANNA, K., OSMAN, G. E. H., & KHIDER, M. Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 515-520, 2015.

PALCICH, G. et al. Enterobacter sakazakii in dried infant formulas and milk kitchens of maternity wards in Sao Paulo, Brazil. **J Food Prot**, v. 72, n. 1, p. 37-42, Jan 2009.

PARNANEN, K. M. M. et al. Early-life formula feeding is associated with infant gut microbiota alterations and an increased antibiotic resistance load. **Am J Clin Nutr**, v. 115, n. 2, p. 407-421, Feb 9 2022.

PEI, X., YANG, S., ZHAN, L., ZHU, J., SONG, X., HU, X., LIU, G., MA, G., LI, N., & YANG, D. . Prevalence of *Bacillus cereus* in powdered infant and powdered follow-up formula in China. **Food Control**, v. 93, p. 101-105, 2018.

PEREIRA, A. D. C. et al. Microbiological evaluation of infant formula manipulated in Centralized Production Unit. **Segur. Aliment. Nutr**, v. 20, n. 2, p. 260-74, 2013.

PRESTES, M.; CREVELARIO DE CARVALHO, E. Lazzaro Spallanzani e a geração espontânea: os experimentos e a controvérsia. **Revista da Biologia**, v. 9, p. 1-6, 2012.

PROUDY, I. [*Enterobacter sakazakii* in powdered infant food formulas]. **Can J Microbiol**, v. 55, n. 5, p. 473-500, May 2009.

RAMARAO, N. et al. Advanced Methods for Detection of *Bacillus cereus* and Its Pathogenic Factors. **Sensors (Basel)**, v. 20, n. 9, May 7 2020.

REDMOND, E. C.; GRIFFITH, C. J.; RILEY, S. Contamination of bottles used for feeding reconstituted powdered infant formula and implications for public health. **Perspect Public Health**, v. 129, n. 2, p. 85-94, Mar 2009.

Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 307, de 14 de novembro de 2002. Altera a Resolução - RDC nº 50 de 21 de fevereiro de 2002 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de

projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2002.

RODRIGUES, C. A. P. **Condições Higienicossanitárias de Lactários Hospitalares de Goiânia**. 2014. 119 (Master). Faculdade de Nutrição (Fanut) , Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde,, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

RODRIGUES, V. C. C. et al. Microbiological risks of infant formulas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, n. e2018056, 2019.

SANI, N. A.; YI., L. Y. Enterobacteriaceae, Cronobacter (Enterobacter) sakazakii and Microbial Population in Infant Formula Products in the Malaysian Market. **Sains Malays**, v. 40, p. 345–351, 2011.

SCHROMM, A. B. et al. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 7, p. 2008-13, Apr 2000.

SEDUC. **Microbiologia dos Alimentos**. CEARÁ, S. D. E. D. Fortaleza: Governo do Estado do Ceará - Secretaria de Educação 66 p. 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5ª. São Paulo: Blucher, 2017. 535 p. ISBN 9788521212256.

SIPKA, S. et al. Comparison of endotoxin levels in cow's milk samples derived from farms and shops. **Innate Immun**, v. 21, n. 5, p. 531-6, Jul 2015.

TOROW, N. et al. Neonatal mucosal immunology. **Mucosal Immunol**, v. 10, p. 5-17, 2017.

TOYOFUKU, H.; KUBOTA, K.; MORIKAWA, K. Outbreaks of Salmonella in infants associated with powdered infant formula. **Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku**, v. 124, p. 74-9, 2006.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 920 ISBN 978-85-388-0677-6.

TUDELA, E. et al. [Microbiological monitoring of milk samples and surface samples in a hospital infant formula room]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 56, n. 5, p. 272-8, Jul 2008.

WANG, X. et al. Characterization of Staphylococcus aureus isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. **Int J Food Microbiol**, v. 153, n. 1-2, p. 142-7, Feb 1 2012.

WATKINS, C. et al. The viability of probiotics in water, breast milk, and infant formula. **Eur J Pediatr**, v. 177, n. 6, p. 867-870, Jun 2018.

WEFFORT, V.R.S. Avanços nutricionais em fórmulas infantis. **PediatriaModerna**. 2012; 48(4):115-20.

WHO. **Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula: guidelines**. Genebra: World Health Organization; colab. Food and Agriculture Organization of the United Nations: 32 p. 2007.

WU, H. et al. Effect of Food Endotoxin on Infant Health. **Toxins (Basel)**, v. 13, n. 5, Apr 22 2021.

WU, L. J. et al. Prevalence, Clinical Characteristics and Changes of Antibiotic Resistance in Children with Nontyphoidal Salmonella Infections from 2009-2018 in Chongqing, China. **Infect Drug Resist**, v. 14, p. 1403-1413, 2021.

WU, S. et al. Microbial community structure and distribution in the air of a powdered infant formula factory based on cultivation and high-throughput sequence methods. **J Dairy Sci**, v. 101, n. 8, p. 6915-6926, Aug 2018.

YANG, B. et al. Prevalence and characterization of Salmonella enterica in dried milk-related infant foods in Shaanxi, China. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 11, p. 6754-60, Nov 2014.

ZHANG, Y. et al. Quantitative Prevalence, Phenotypic and Genotypic Characteristics of Bacillus cereus Isolated from Retail Infant Foods in China. **Foodborne Pathog Dis**, v. 14, n. 10, p. 564-572, Oct 2017.

## ANEXO 1

### Tabela Número Mais Provável (NMP)

**Tabela NMP-1.** Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada da amostra: 0,1 - 0,01 e 0,001g ou ml.

Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006).

Retirada de SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA (2017).

## ANEXO 2

Endereços eletrônicos para acessar as informações referente às fórmulas infantis utilizadas na pesquisa.

Tipo da Fórmula	Endereço Eletrônico
Fórmula 1: Pré nan	<a href="https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/pre?gclsrc=aw.ds&amp;gclid=Cj0KCQjw_dWGBhDAARIsAMcYuJxu9hfW5QYNp_ERuNANOedZWghcKaETGNyhYBtJdqS1c-JmLijrgloaAqVkeALw_wcB">https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/pre?gclsrc=aw.ds&amp;gclid=Cj0KCQjw_dWGBhDAARIsAMcYuJxu9hfW5QYNp_ERuNANOedZWghcKaETGNyhYBtJdqS1c-JmLijrgloaAqVkeALw_wcB</a>
Fórmula 2: Nan ha	<a href="https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/nan-ha">https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/nan-ha</a>
Fórmula 3 Nan pro 1	<a href="https://patiogourmet.com.br/online/produto/leite-em-po-nan-pro-1-nestle-lata-800-g/207">https://patiogourmet.com.br/online/produto/leite-em-po-nan-pro-1-nestle-lata-800-g/207</a>
Fórmula 4: Nestogeno 1	<a href="https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/1">https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/1</a>
Fórmula 5: Aptamil pré	<a href="https://www.bemolfarma.com.br/mobile/formula-infantil-danone-aptamil-pre-0-2-anos-ou-mais-400g-p1034866">https://www.bemolfarma.com.br/mobile/formula-infantil-danone-aptamil-pre-0-2-anos-ou-mais-400g-p1034866</a>
Fórmula 6: Aptamil ha	<a href="https://www.alobebe.com.br/leite-aptamil-ha-800g.html,23613?o=8718117604425">https://www.alobebe.com.br/leite-aptamil-ha-800g.html,23613?o=8718117604425</a>
Fórmula 7: Aptamil (profutura) 1	<a href="https://www.amazon.com.br/Aptamil-Pro-Futura-400G-Nv/dp/B07MBTSQ6V/ref=asc_df_B07MBTSQ6V/?tag=googleshopp06-20&amp;linkCode=df0&amp;hvadid=404788689327&amp;hvpos=&amp;hvnetw=g&amp;hvrand=9511727793039308654&amp;hvpone=&amp;hvptwo=&amp;hvqmt=&amp;hvdev=m&amp;hvdvcmdl=&amp;hvlocint=&amp;hvlocphy=9074170&amp;hvtargid=pla-912113866957&amp;psc=1">https://www.amazon.com.br/Aptamil-Pro-Futura-400G-Nv/dp/B07MBTSQ6V/ref=asc_df_B07MBTSQ6V/?tag=googleshopp06-20&amp;linkCode=df0&amp;hvadid=404788689327&amp;hvpos=&amp;hvnetw=g&amp;hvrand=9511727793039308654&amp;hvpone=&amp;hvptwo=&amp;hvqmt=&amp;hvdev=m&amp;hvdvcmdl=&amp;hvlocint=&amp;hvlocphy=9074170&amp;hvtargid=pla-912113866957&amp;psc=1</a>
Fórmula 8: Nan confor 1	<a href="https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/nan-800g">https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/nan-800g</a>
Fórmula 9: Nestogeno 2	<a href="https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/1-2kg#">https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/1-2kg#</a>
Fórmula 10: Nan supreme 1	<a href="https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/nan-supreme-1-formula-infantil-lata-800g?gclsrc=aw.ds&amp;gclid=CjwKCAjwieuGBhAsEiwA1Ly_nUxdHYejn7xXUr5x7rINVA7zutfFvUlow4cJRFbowqfiAHRWIWCPuhoCrJ4QAvD_BwE">https://www.nestlebabyandme.com.br/nossas-marcas/formulas-infantis/nan-supreme-1-formula-infantil-lata-800g?gclsrc=aw.ds&amp;gclid=CjwKCAjwieuGBhAsEiwA1Ly_nUxdHYejn7xXUr5x7rINVA7zutfFvUlow4cJRFbowqfiAHRWIWCPuhoCrJ4QAvD_BwE</a>
Fórmula 11: Aptamil Ar	<a href="https://www.amazon.com.br/Aptamil-Ar-800G-Nv/dp/B07MFFRG73#immersive-view_1624996698717">https://www.amazon.com.br/Aptamil-Ar-800G-Nv/dp/B07MFFRG73#immersive-view_1624996698717</a>
Fórmula 12: Nan sem lactose	<a href="https://www.nestlebebe.pt/produtos-e-marcas/leites-infantis-e-leites-de-crescimento/leites-especiais/nan-sem-lactose#">https://www.nestlebebe.pt/produtos-e-marcas/leites-infantis-e-leites-de-crescimento/leites-especiais/nan-sem-lactose#</a>
Fórmula 13: Pregomin	<a href="https://www.danonenutricia.com.br/produtos/infantil/formulas-infantis/formula-infantil-pregomin-400g">https://www.danonenutricia.com.br/produtos/infantil/formulas-infantis/formula-infantil-pregomin-400g</a>
Fórmula 14 Aptamil Premium 1	<a href="https://www.danonenutricia.com.br/produtos/infantil/formulas-infantis/aptamil-premium-1-800g1#">https://www.danonenutricia.com.br/produtos/infantil/formulas-infantis/aptamil-premium-1-800g1#</a>